



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Infeção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* numa população de homens que têm sexo com homens (HSH): avaliação de técnica de PCR em Tempo Real.

M^a Margarida Domingues da Silva Cordeiro Leal

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

NOVEMBRO, 2018



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Infeção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* numa população de homens que têm sexo com homens (HSH): avaliação de técnica de PCR em Tempo Real.

Mestranda: M^a Margarida Domingues da Silva Cordeiro Leal

Orientadora: Professora Doutora Rita Castro

Coorientadora: Professora Doutora Filomena Pereira

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

NOVEMBRO, 2018

Agradecimentos

Concluído este trabalho, é com um enorme contentamento que exprimo o meu agradecimento, pelo apoio incondicional e dedicação das pessoas que me ajudaram a cumprir os meus objetivos e a realizar mais uma etapa da minha formação académica.

À Professora Doutora Rita Castro, agradeço a sua pronta disposição em facultar mais um tema de Tese e em ter aceitado ser a minha orientadora. Agradeço a forma calorosa como me recebeu e integrou no departamento das Doenças Sexualmente Transmissíveis, os seus preciosos conselhos e apoio perante todos os contratemplos e alguns obstáculos decorrentes do processo; o tempo que comigo teve a gentileza de partilhar – no longo período das inúmeras otimizações das técnicas de biologia molecular –, bem como, no decorrer da revisão de aspetos formais do meu trabalho. Foi inexcedível e por tudo isso, a minha sincera gratidão.

À Professora Doutora Filomena Pereira, agradeço, não só por se ter disponibilizado para ser coorientadora da minha tese, mas também pelo seu tempo e apoio ao longo desta etapa, pela sua dedicação, nomeadamente por todos os conselhos facultados durante a execução deste projeto.

À Doutora Ângela Mendes do departamento das Doenças Sexualmente Transmissíveis, agradeço a sua disponibilidade, boa disposição, ajuda e conhecimento, partilhado na execução das técnicas moleculares e serológicas realizadas durante este estudo.

A todos os elementos do Checkpoint, sem os quais, este trabalho não teria sido realizável.

Aos meus pais, Jorge e Cândida, pelo amor incondicional, o apoio emocional e financeiro, pelo incentivo, conselhos e força que me transmitiram ao longo de todo o processo. Pela motivação que me incutiram, nos momentos mais exasperantes e frustrantes, por me ajudarem a encontrar sempre o lado positivo em cada contratempo e por, acima de tudo, acreditarem completamente em mim e nas minhas capacidades.

Aos meus tios, Zé e Vina, pelo seu acompanhamento, sempre interessado e contínuo, e pelos seus sábios conselhos, recebidos no decurso da minha tese.

Às minhas amigas, que também batalhavam nas suas próprias teses e, ainda assim, sempre me apoiaram, pondo em perspectiva a situação e oferecendo palavras de ânimo e de carinho.

Ao Henrique pelo apoio, carinho, paciência, conselhos e ajuda que me facultou ao longo da elaboração deste projeto.

Muito obrigada!

Resumo

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível, de distribuição mundial, que emergiu na Europa há mais de 500 anos. O seu agente etiológico é *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, que tem o ser humano como o seu hospedeiro natural. *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* pertence ao filo das *Spirochaetes*, à ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae* e ao género *Treponema*. Estes são microrganismos procariotas espiralados, flexíveis, filamentosos de extremidades afiladas, bacilos finos e helicoidais que apresentam uma mobilidade em “saca-rolhas” consequência da sua forma espiralada. A infeção por *Treponema pallidum* evolui em quatro estádios (sífilis primária, secundária, latente e terciária) com períodos sintomáticos e assintomáticos. O diagnóstico da sífilis é difícil, principalmente durante os períodos de latência é dependente de dados clínicos e laboratoriais, uma vez que não existe nenhum teste que possibilite um diagnóstico definitivo em todos os estádios da doença.

Os objetivos deste estudo compreendem a análise do valor diagnóstico dos testes serológicos TPHA, Determine e RPR, assim como de uma técnica de PCR em Tempo Real (PCR-TR), comparando-a também com a técnica de PCR-Multiplex (PCR-M).

De entre os testes serológicos, o Determine apresentou uma maior reatividade quando comparado com o TPHA e o RPR, apesar da discrepância observada entre os dois testes treponémicos ser mínima (2,7%). Como esperado, observou-se uma diferença significativa entre o RPR e os testes treponémicos (30,2%), que em grande parte poderá ser devido a casos de sífilis curada. Em relação à pesquisa de DNA de *T. pallidum* observou-se uma taxa de concordância entre as duas técnicas de PCR (Multiplex e Tempo Real) de 92,6%. A técnica de PCR-M foi capaz de identificar DNA num maior número de amostras de sangue (8,3%) do que a técnica de PCR-TR (2,8%), mas esta última identificou-o num maior número de amostras de lesões (26%) versus PCR-M (12%). A pesquisa de DNA de *T. pallidum* pela técnica de PCR-M foi efetuada utilizando dois genes (*Lp 47kDa* e *PolA*): o fragmento do gene *Lp 47kDa* foi identificado num número superior de amostras de lesões e de sangue do que o fragmento *PolA*. A técnica de PCR-TR apenas efetuou a pesquisa do fragmento do gene *PolA*.

Deste estudo foi possível inferir que: a) o teste Determine demonstrou ser comparável aos testes RPR e TPHA, b) o gene *Lp 47kDa* pareceu ser mais fácil de identificar nas amostras estudadas, c) a identificação dos dois permite detetar DNA de *T. pallidum* num maior número de amostras, d) em relação à comparação das duas técnicas de PCR verificou-se que o tipo de amostra analisada tem um impacto nos resultados obtidos por esta metodologia e parece que com a técnica de PCR-TR se obtém melhores resultados em amostras de lesões do que de sangue.

Palavras-Chave: PCR-M, PCR-TR, Serologia, Sífilis, *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*.

Abstract

Syphilis is a sexually transmitted disease with worldwide distribution that emerged in Europe over 500 years ago. *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* is the etiological agent of syphilis and its natural host is the human body. This bacterium belongs to the phylum *Spirochaetales*, the family *Spirochaetaceae* and the genus *Treponema*. These prokaryote microorganisms are motile spiral-shaped, moving with a corkscrew motion, bending and flexing, characteristic of its spiral form. Infection by *Treponema pallidum* occurs in four different stages (primary, secondary, latent and tertiary), evolving from one phase to the next, with symptomatic and asymptomatic periods. The diagnosis of this disease is both complex and difficult, especially during the latent phase and relies heavily on clinical and laboratory data, due to the lack of a gold standard test, able to identify the disease in all stages.

The aim of this thesis was to analyse the diagnostic value of the TPHA, Determine and RPR tests, as well as the value of our Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR-RT), also by comparison with a PCR-Multiplex technique.

Our results showed that among the serological tests, Determine had the highest reactivity when compared to both TPHA and RPR, although a slight discrepancy was observed (2,7%) between the two treponemic tests. As expected, a significant discrepancy was detected between the RPR and treponemic tests (30,2%), which was mainly attributed to treated syphilis cases. In regard, to the identification of *T. pallidum* DNA, an agreement of 92,6% was found between both PCR techniques (PCR-RT & PCR-M). The PCR-M technique was able to identify DNA in a larger number (8,3%) of blood samples than the PCR-RT, however this technique identified DNA in a higher number (26%) of lesion samples versus the PCR-M (12%). The PCR-M technique was used to identify the fragments of two genes (*Lp 47kDa* & *PolA*), while the PCR-RT only used the *PolA* gene fragment. The *PolA* gene fragment was identified in a lesser number of blood and lesion samples than the *Lp 47kDa*.

In regard to this thesis results, the following conclusions were deduced: a) the Determine test proved to be comparable to the RPR and TPHA tests, b) the simultaneous identification by two genes allowed for the detection of *T. pallidum* DNA in a greater number of samples, c) the gene *Lp 47kDa* was identified more often in the samples analysed, d) when the PCR techniques were compared the type of sample analysed had a direct impact on the technique's performance. Furthermore, it seems that with the PCR-RT technique better results were achieved, when applied to lesion samples than blood.

Keywords: PCR-M, PCR-RT, Serology, Syphilis, *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*.

Índice

Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	x
Índice de Abreviaturas.....	xii

I. Introdução.....	1
I.I Taxonomia & Classificação.....	1
I.I a. Caraterização do Género <i>Treponema</i>	1
I.I b. Caraterização de <i>Treponema pallidum</i> subespécie <i>pallidum</i>	2
I.I c. Caraterísticas Culturais.....	3
I.II Contextualização Histórica.....	4
I.III Evolução da Doença & Sintomatologia.....	5
I.III a. Sífilis Primária.....	6
I.III b. Sífilis Secundária.....	9
I.III c. Sífilis Latente.....	11
I.III d. Sífilis Terciária.....	11
I.III d.1. Neurosífilis.....	12
I.III e. Sífilis Congénita.....	13
I.IV Diagnóstico Clínico & Laboratorial.....	14
I.IV a. Método de deteção direta de <i>Treponema pallidum</i>	15
I.IV b. Métodos Serológicos.....	16
I.IV b.1. Testes Não Treponémicos.....	16
I.IV b.2. Testes Treponémicos.....	19
I.IV b.3. Testes Rápidos – Point of Care.....	22
I.IV c. Técnicas de Biologia Molecular.....	24
I.V Patogenicidade & Imunidade.....	25
I.VI Transmissão & Epidemiologia.....	27
I.VI a. População HSH.....	31
I.VII Tratamento & Prevenção.....	32
I.VIII Objetivos do Estudo & Justificação da Tese.....	35

II. Materiais & Métodos.....	36
II.I Testes Serológicos – Pesquisa de anticorpos anti- <i>Treponema pallidum</i>	36
II.I a. Teste Não Treponémico.....	36
II.I b.1. Teste Treponémico – TPHA.....	38
II.I b.2. Teste Treponémico – Teste Anti-Sífilis.....	40
II.I b.3. Teste Treponémico – Determine.....	41
II.II Pesquisa de DNA de <i>Treponema pallidum</i>	42
II.II a. Extração de DNA Total.....	42
II.II b. Pesquisa de DNA de <i>T. pallidum</i> por técnica de PCR-Multiplex.....	44
II.II b.1. Visualização do produto amplificado.....	46
II.II c. Pesquisa de DNA de <i>T. pallidum</i> por técnica de PCR em Tempo Real.....	48
III. Resultados.....	51
III.I Pesquisa de anticorpos anti- <i>Treponema pallidum</i>	51
III.II Pesquisa de DNA de <i>Treponema pallidum</i>	54
III.II a. Técnica de PCR-Multiplex.....	54
III.II b. Técnica de PCR em Tempo Real.....	55
III.II c. Comparação entre as técnicas de PCR – Multiplex e Tempo Real.....	57
IV. Discussão & Conclusões Finais.....	59
IV.I Serologia - Pesquisa de anticorpos anti- <i>Treponema pallidum</i>	62
IV.II Pesquisa de DNA de <i>Treponema pallidum</i>	70
IV.III Conclusões Finais.....	78
V. Referências Bibliográficas.....	80

Índice de Figuras

Figura. 1. Fotografia de <i>T. pallidum</i> subespécie <i>pallidum</i> estripe de Nichols, obtida por microscopia eletrónica.....	1
Figura. 2. Fotografia de <i>T. pallidum</i> obtida por microscopia eletrónica em corte transversal.....	3
Figura. 3. Esquema da progressão da infeção sífilítica não tratada.....	6
Figura. 4. Fotografia de uma lesão de sífilis primária no pénis. Úlcera bem visível, com rebordos redondo e aparência de “botão”	7
Figura. 5. Fotografia de uma lesão sífilítica primária na língua.....	8
Figura. 6. Fotografia de uma lesão sífilítica primária atípica anal.....	8
Figura. 7. Fotografia de lesão sífilítica secundária no pé e mão.....	10
Figura. 8. Fotografia de lesão típica de sífilis secundária, <i>condilomata lata</i> perivulvar e perianal.....	10
Figura. 9. Fotografia de <i>T. pallidum</i> obtida por microscopia de fundo escuro.....	15
Figura. 10. Mapa da União Europeia, ilustrando o aumento e diminuição de novos casos de sífilis registados durante o período de 2008 a 2013.....	30
Figura. 11. Número de casos novos de sífilis notificados por ano, em Portugal desde 1950 até 2015.....	31
Figura. 12. Exemplo ilustrativo de resultados reativos, moderadamente reativos e não reativos de um teste RPR.....	37
Figura. 13. Esquema das diluições efetuadas para titular uma amostra reativa pela avaliação qualitativa, título do doente 1:4.....	38
Figura. 14. Ilustração do teste RPR num cartão Macro-Vue com as diluições seriadas da amostra de plasma de um doente.....	38
Figura. 15. Esquema da organização e distribuição dos reagentes pela placa de microtitulação.....	39
Figura. 16. Esquema da reação de aglutinação entre eritrócitos sensibilizados na presença e na ausência de anticorpos anti- <i>T. pallidum</i>	39
Figura. 17. Teste rápido <i>Anti-Sífilis</i> da Laboquick.....	40
Figura. 18. Teste rápido <i>Determine</i> da Alere.....	41
Figura. 19. Esquema de extração usando colunas QIAamp.....	44

Figura. 20. Fotografia de um gel de agarose de 1,5% exposto a luz UV para visualização dos produtos amplificados pela técnica de PCR-M.....	47
Figura. 21. Gráfico obtido pela técnica de PCR-TR resultante do estudo de amostras de lesões.....	50

Índice de Tabelas

Tabela 1. Caraterísticas de <i>T. pallidum</i> subespécie <i>pallidum</i>	2
Tabela 2. Cronologia histórica dos testes não treponémicos.....	17
Tabela 3. Comparação da sensibilidade e especificidade dos testes não treponémicos...	18
Tabela 4. Cronologia histórica dos testes treponémicos.....	20
Tabela 5. Comparação da sensibilidade e especificidade dos testes treponémicos.....	20
Tabela 6. Caraterísticas ideais de um teste rápido: Critério “ASSURED”	22
Tabela 7. “Primers” utilizados na técnica de PCR-Multiplex.....	44
Tabela 8. Composição da mistura de reação para a técnica de PCR-M.....	46
Tabela 9. Condições de amplificação para a técnica PCR-M.....	46
Tabela 10. “Primers” e sonda utilizados para a amplificação de um fragmento do gene da enzima DNA Polimerase I de <i>T. pallidum</i> pela técnica de PCR-TR.....	48
Tabela 11. Composição da mistura de reação utilizada na técnica de PCR em Tempo Real.....	49
Tabela 12. Condições de amplificação da técnica de PCR-TR.....	49
Tabela 13. Resultados dos testes RPR, TPHA e Determine.....	51
Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos com os testes RPR vs. TPHA.....	52
Tabela 15. Comparação dos resultados obtidos com o Determine vs. RPR.....	52
Tabela 16. Comparação dos resultados obtidos com os testes Determine vs. TPHA.....	53
Tabela 17. Resultados dos testes TPHA, Determine e Anti-Sífilis.....	53
Tabela 18. Resultados obtidos nas amostras de sangue pela técnica de PCR-M.....	54
Tabela 19. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M de acordo com os genes <i>PolA</i> e <i>Lp 47kDa</i>	54
Tabela 20. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M nas amostras de lesões.....	55
Tabela 21. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M de acordo com os genes <i>PolA</i> e <i>Lp 47kDa</i>	55
Tabela 22. Resultados obtidos pela técnica de PCR-TR nas amostras de sangue.....	56
Tabela 23. Resultados obtidos pela técnica de PCR em Tempo Real nas amostras de lesões.....	56
Tabela 24. Resultados dos testes serológicos obtidos a partir de amostras de sangue correspondentes a amostras de lesões estudadas pela técnica de PCR-TR.....	57

Tabela 25. Comparação das técnicas de PCR Multiplex e Tempo Real – amostras de sangue.....	58
Tabela 26. Comparação das técnicas de PCR-M e PCR-TR na amplificação das amostras de lesões.....	58
Tabela 27. Resultados de estudos de avaliação do teste POC (Determine).....	66

Índice de Abreviaturas

%	Percentagem
°C	Grau <i>Celsius</i>
∞	Infinito
kDa	Kilodalton
m	minutos
s	segundos
1X	Concentração
cm	Centímetro
g	Grama
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MU	Milhões de unidades
rpm	Rotações por minuto
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Micro litro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
U	Unidades
4D	Gene de <i>Treponema pallidum</i> estirpe Nichols
C3	Componente 3 do complemento, proteína do sistema imune
“C”	Controlo
CC	Células Controlo
CDC	Centro para Prevenção e Controlo de Doenças – EUA, do inglês <i>Centre for Disease Control and Prevention</i>
CT	Células Teste
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
ECDC	Centro para Prevenção e Controlo de Doenças Europeu, do inglês <i>European Centre for Disease Control and Prevention</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA	Teste imunoenzimático
<i>et al.</i>	“E outros”, da locução latina <i>et alii</i>
FTA	Teste de imunofluorescência
FTA-ABS	Teste de imunofluorescência modificado por absorção
FTA-ABS DS	Teste de imunofluorescência modificado por absorção
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>
HSH	Homens que têm sexo com homens
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
INE	Instituto Nacional de Estatística
IST	Infeções Sexualmente Transmissíveis
IUSTI	“International Union against Sexually Transmitted Infections”
KO3/KO4	Sequência de primers para pesquisa do gene <i>Lp 47kDa</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
<i>LP 47kDa</i>	Gene que codifica a lipoproteína membrana de 47 kDa
LPS	Lipopolissacáridos
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MHA-TP	Testes de hemaglutinação em microplaca
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>WHO – World Health Organization</i>
pb	Par de bases
<i>PolA</i>	Gene da enzima DNA polimerase I
PBS	Tampão Fosfato-Salino, do inglês <i>Phosphate Bufferes Saline</i>
PCR	Reação de polimerase em cadeia, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR <i>PolA</i>	PCR que tem como alvo o gene <i>PolA</i>
PCR <i>Lp 47kDa</i>	PCR que tem como alvo o gene <i>Lp 47kDa</i>
PCR-M	PCR Multiplex
PCR-TR	PCR em Tempo Real
pH	Potencial hidrogeniônico
POC	Testes rápidos, do inglês <i>Point-of-Care</i>

RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico, do inglês <i>ribossomal ribonucleic acid</i>
RPR	Testes rápido em plasma, do inglês <i>Rapid Plasma Reagin</i>
RST	Teste de Rastreio Reaginas, do inglês <i>Rapid Syphilis Test</i>
“S”	“Sample”
<i>subsp.</i>	Subespécie
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
“T”	Teste
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
<i>T. pallidum</i>	<i>Treponema pallidum</i>
Tp-PCR	PCR utilizado na identificação de <i>Treponema pallidum</i>
TRUST	“Toluidine Red Unheated Serum Test”
TpN47	Lipoproteína membrana imunogénica de <i>Treponema pallidum</i>
TPHA	Teste de hemaglutinação
TPPA	“ <i>Treponema pallidum</i> Particle Agglutination Assay”
TPI	Teste de Imobilização
TmpA	Proteína membrana A do <i>Treponema pallidum</i>
USR	“Unheated Serum Reagin Test”
V	Volts
VDRL	Teste de Laboratório de pesquisa de Doenças Venéreas, do inglês <i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
<i>VP PolA</i>	Primers para a pesquisa do gene <i>PolA</i>
WR	Wassermann Reaction – teste não treponémico

I. Introdução

I.I Taxonomia & Classificação

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível, de distribuição mundial, que emergiu na Europa há mais de 500 anos. O seu agente etiológico é a bactéria *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, sendo o ser humano o seu hospedeiro natural (LaFond e Lukehart. 2006). A bactéria, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, pertence ao filo das *Spirochaetes*, à ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae* e ao género *Treponema*. O filo das *Spirochaetes* está subdividido em duas famílias, *Spirochataceae* e *Leptospiraceae*, mas só os géneros – *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira* – têm interesse médico, por causarem doenças no ser humano. (Murray *et al.* 2015)

I.I a. Caracterização do Género *Treponema*

As bactérias do género *Treponema* são microrganismos procariotas espiralados, flexíveis, filamentosos de extremidades afiladas. Caracterizam-se por serem bacilos finos, helicoidais com cerca de 6 a 12 espirais regulares, com um comprimento de 5 – 15 µm ao longo do eixo longitudinal, um diâmetro de 0,1 – 0,2 µm e com um comprimento de onda e amplitude de 1,1 µm e 0,4 µm em perfil sinusoidal (Norris *et al.* 2001). Devido às suas pequenas dimensões, não é possível observar esta bactéria através de um microscópio ótico de fundo claro, sendo necessário a utilização de um microscópio com uma resolução superior, como o de fundo escuro, o de contraste de fase e/ou o de microscopia eletrónica de transmissão (Figura. 1) (Norris *et al.* 2001, Holmes *et al.* 2008).

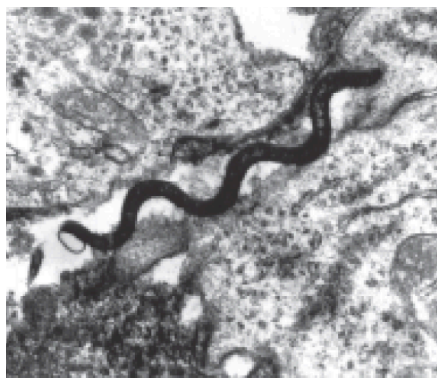


Figura. 1 – Fotografia de *T. pallidum* subespécie *pallidum* estripe de Nichols, obtida por microscopia eletrónica.

(Adaptado de Norris *et al.* 2001)

As espiroquetas são bactérias anaeróbias facultativas com capacidade móvel através de movimentos de rotação, flexão e alguma translação, apresentam uma mobilidade única no mundo das bactérias, devido à sua forma espiralada como um “saca-rolhas”. Estruturalmente são constituídas por uma camada fina de peptidoglicano, uma membrana citoplasmática, um cilindro protoplasmático, com flagelos periplasmáticos (endoflagelos) longitudinais de extremo a extremo responsáveis pelo seu movimento, e espaço periplasmático, tendo a parede celular semelhante à das bactérias de Gram-negativo (Holmes *et al.* 2008).

I.I b. Caracterização de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*

A bactéria *T. pallidum* subespécie *pallidum*, tal como todas as espiroquetas, apresenta morfologia helicoidal, com o corpo ondulado em forma de saca-rolhas (Figura.1). Com uma membrana celular dupla típica, partilha características tanto com as bactérias Gram-negativas como positivas (Castro. 2004). Apesar desta semelhança com as bactérias de Gram-negativo, a membrana celular exterior das espiroquetas não contém os lipopolissacáridos (LPS) (Fraser *et al.* 1998, Hardy e Levin. 1983), característicos daquelas bactérias. As espécies do género *Treponema* patogénicas para o homem são semelhantes entre si relativamente à sua morfologia, fisiologia e conteúdo em DNA. *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* diferencia-se das restantes pela sua distribuição geográfica no mundo, modo de transmissão e tipo de infeção que origina (Tabela 1).

Tabela 1. Características de *T. pallidum* subespécie *pallidum*.

Doença	Distribuição	Patogenicidade Humana
Sífilis	Mundial	Muito invasivo: Infeção local e sistémica Estádios – Recente, Latente, Tardio e Congénito

(Adaptado de Norris *et al.* 2001)

Relativamente às suas características estruturais, a membrana externa deste microrganismo serve como uma barreira protetora em relação ao meio ambiente, pois limita a superfície celular externa, enquanto que a membrana interna (citoplasmática) engloba ou circunda o cilindro protoplasmático. Entre as duas membranas existe o espaço periplasmático, onde se encontram localizados os organelos de motilidade, denominados flagelos periplasmáticos ou endoflagelos, devido à sua localização neste espaço. Os

endoflagelos encontram-se presentes em grupos de dois a quatro nas extremidades da célula, enrolando-se à volta do cilindro protoplasmático. Para além da motilidade, são também responsáveis pela indução de uma resposta imunológica no hospedeiro, devido à presença de proteínas flagelares de natureza antigénica nestes organelos, que são reconhecidas pelos anticorpos dos hospedeiros infetados (LaFond e Lukehart. 2006, Castro. 2004). A localização no espaço periplasmático e a sua forma em espiral, são responsáveis pelo aumento da motilidade da bactéria em meios de maior viscosidade como os fluídos corporais oculares e das articulações (Holmes *et al.* 2008).

Um corte transversal de *T. pallidum* com a divisão das duas membranas celulares e os endoflagelos, está ilustrado na Figura 2.

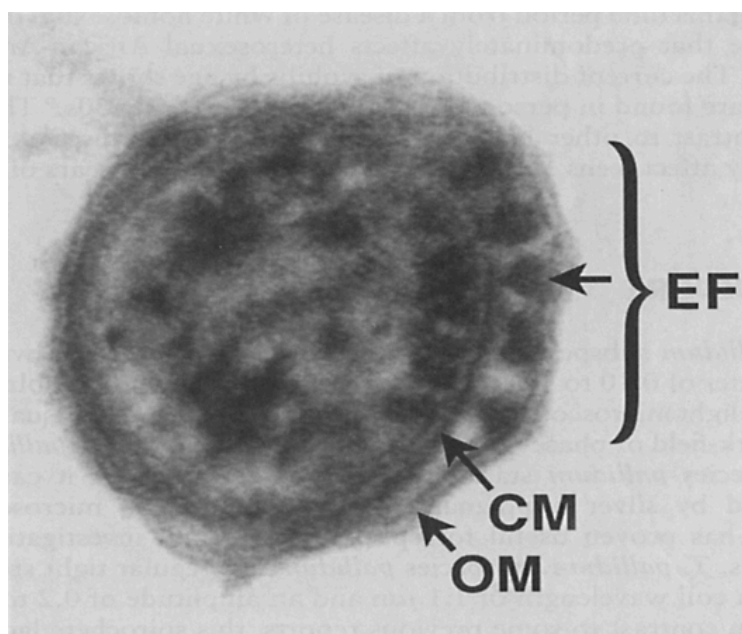


Figura. 2 – Fotografia de *T. pallidum* obtida por microscopia eletrónica em corte transversal. Abreviaturas: OM (membrana externa), CM (membrana citoplasmática), EF (endoflagelo).

(Adaptado de Holmes *et al.* 2008)

I.I c. Caraterísticas Culturais

Treponema pallidum subespécie *pallidum* não consegue sobreviver sem um hospedeiro mamífero. A sua capacidade infecciosa desaparece algumas horas ou dias após colheita, o que torna o seu estudo em laboratório complicado (LaFond e Lukehart. 2006). A bactéria é extremamente sensível às condições do meio, tais como o pH, a temperatura, o oxigénio e agentes químicos e físicos, pelo que a sua propagação “in vitro” é inviável, sendo apenas possível em animais de laboratório (Hollander e Turner. 1957). O coelho é, de

todos os animais, o mais utilizado para a inoculação da bactéria, uma vez que nele a infecção se desenvolve de modo semelhante à infecção humana, observando-se estádios primário e latente, mas sem manifestações de fase secundária e terciária (Castro. 2004, Norris *et al.* 2001). A taxa de divisão deste microrganismo é lenta sendo necessárias cerca de 30 a 33 horas para a sua duplicação (Magnuson e Eagle. 1948; Cumberland e Turner. 1949 citados por Norris *et al.* 2001).

I.II Contextualização Histórica

A infecção por *Treponema pallidum pallidum* origina a sífilis venérea, uma doença infecciosa crônica disseminada, que é caracterizada por ter estádios sintomáticos e assintomáticos. Esta infecção recebeu a designação atual devido a um poema designado por “*Syphilis sive morbus gallicus*” escrito pelo médico Girolamo Francastor em 1530 (Quérel. 1992). Nele o autor descrevia as manifestações da sífilis, doença que o protagonista da história (Syphilus) sofria (Holmes *et al.* 2008, Castro. 2004). A sífilis foi uma doença extremamente difícil de identificar e diagnosticar ao longo dos séculos, tendo sido confundida e diagnosticada incorretamente como lepra e cancroide, ou mesmo como um efeito secundário da infecção por *N. gonorrhoeae*. Só no início do século XIX, devido aos estudos do médico cirurgião Philippe Ricord, em 1838 as duas infecções foram reconhecidas como infecções diferentes, tendo este investigador descrito os três estádios da sífilis. Mais tarde em 1861 Jonathan Hutchinson, um cirurgião britânico, descreveu as características da sífilis congênita (Frith. 2012).

Em 1905, através dos esforços do dermatologista Erich Hoffmann (1871-1906) e do zoologista Fritz Schaudinn (1868-1959), o agente etiológico da sífilis é pela primeira vez identificado. Estes investigadores denominaram-no como *Spirochaeta pallida*, tendo mais tarde alterado o nome para *Treponema pallidum* (Tampa *et al.* 2014). Ao longo dos séculos esta doença teve várias designações consoante as regiões geográficas onde surgia, desde a “doença espanhola”, “doença francesa”, “doença Napolitana”, “doença alemã”, “mal de Nápoles”, “doença gálica”, “doença polaca”, “grosse verole” entre outros, até começar a ser reconhecida como “The Great Pox” (Frith. 2012, Beck. 1997). Esta designação surgiu após a sua expansão pela Europa de uma forma repentina e com sintomatologia muito severa, durante a última década do século XV, em oposição a outra doença igualmente devastadora, a varíola que era conhecida como a “small pox” (Holmes *et al.*

2008). Apesar da bactéria só ter sido corretamente identificada no século XIX, o primeiro surto documentado ocorreu na Europa em 1495, sob a forma de surto pandêmico de sífilis, com estádios primário e secundário muito mais severos que os que se observam atualmente (Holmes *et al.* 2008).

Até ao início do século XX acreditava-se que a sífilis tenha tido a sua origem no “Novo Mundo”, tendo sido introduzida no “Velho Mundo”, em 1493, pela tripulação de Cristóvão Colombo, após o seu regresso do continente Americano. Esta hipótese resulta da coincidência entre a sua chegada e o início da epidemia, assumindo-se que a doença provinha da população indígena que a tinha transmitido à tripulação, tendo-se disseminado rapidamente numa população sem imunidade e por isso particularmente suscetível (Holmes *et al.* 2008). Naquele período a Europa estava envolta em guerra, havendo grandes movimentações de tropas dos diversos exércitos pela região, o que foi sem dúvida uma das principais causas da rápida propagação desta doença sexualmente transmissível (Holmes *et al.* 2008).

Em 1934, uma outra teoria defendida por Richmond Cranston Holcomb, coloca a hipótese da sífilis ser uma doença do “Velho Mundo” existente previamente à viagem de Colombo (Frith. 2012). Nos anos 80, paleopatologistas descobriram possíveis provas que pareciam sustentar a teoria sugerida em 1934, de que a sífilis já existente na Europa, teria no fim do século XV, sofrido uma mutação evoluindo e tornando-se muito mais virulenta (Frith. 2012). Apesar de ainda não ser possível confirmar qual das duas teorias é verdadeira, existe forte conjectura que a sífilis venérea não apareceu subitamente na Europa em 1493, mas que já era endêmica, tornando-se mais severa e disseminando-se como consequência das guerras na Europa, que coincidiram com o retorno de Colombo (Holmes *et al.* 2008).

Um consenso claro sobre a origem da sífilis ainda não existe, apesar de subsistirem argumentos e estudos que suportam ambas as teorias (Holmes *et al.* 2008).

I.III Evolução da Doença & Sintomatologia

A infeção por *Treponema pallidum* se não for tratada pode progredir durante décadas, evoluindo por diferentes estádios, com períodos sintomáticos e assintomáticos. Cada um dos estádios da doença apresenta manifestações clínicas e patologias específicas (LaFond e Lukehart. 2006). Os estádios mais precoces são designados por estádios primário e secundário. Nestes os doentes apresentam sintomatologia e se não forem tratados, a

infecção pode evoluir para um estágio crônico. Após os estádios, primário e secundário, a doença progride para um estágio assintomático, a sífilis latente. A doença pode permanecer nesta fase por longos períodos, décadas até, sem expressão clínica. A sintomatologia poderá surgir anos mais tarde, no estágio terciário, o mais severo de todos (LaFond e Lukehart. 2006, Holmes *et al.* 2008). Na Figura 3 encontra-se esquematizada a progressão natural da infecção sífilítica.

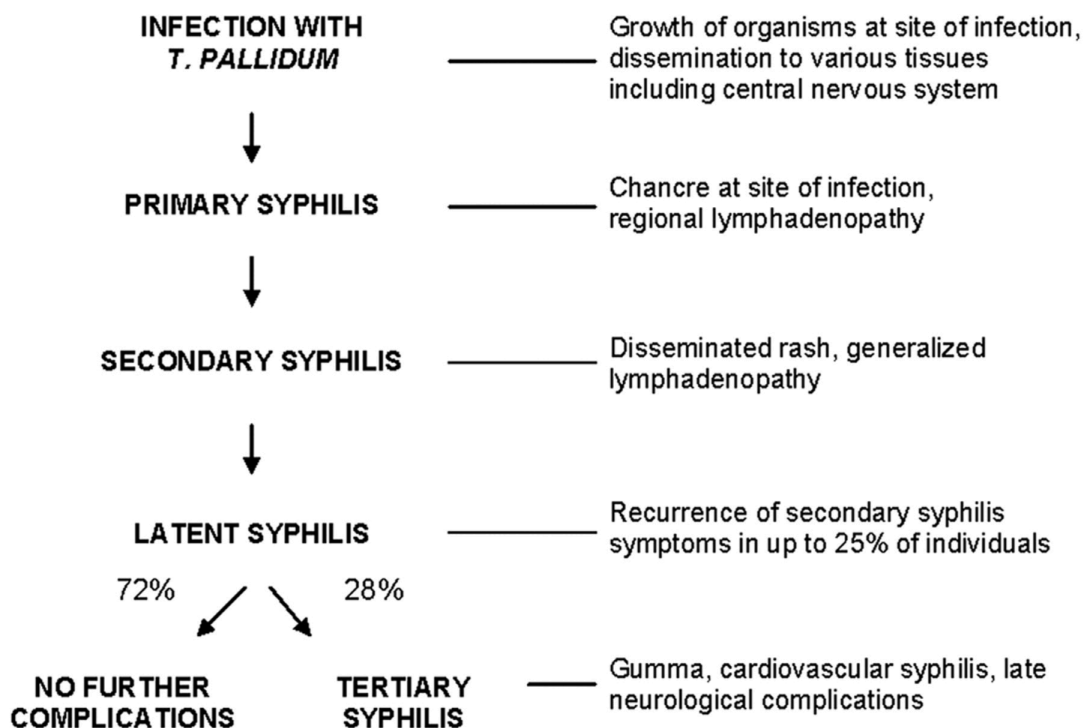


Figura. 3 – Esquema da progressão da infecção sífilítica não tratada.

(Adaptado de Gjestland. 1955, citado por LaFond e Lukehart. 2006)

I.III a. Sífilis Primária

A sífilis primária, como o nome indica, é a primeira fase sintomática da infecção sífilítica. A bactéria invade o hospedeiro pela penetração superficial das mucosas e/ou através de pequenas erosões na camada da epiderme, iniciando a sua multiplicação por divisão binária no local de inoculação, com um período de geração de cerca de 30 horas (Mahoney e Bryant. 1933, LaFond e Lukehart. 2006). Após a inoculação de *T. pallidum*, inicia-se um período de incubação (cerca de 3 a 90 dias) sem sintomatologia (Castro. 2004). Durante este período a bactéria dissemina-se (Larsen *et al.* 1998), entrando na corrente sanguínea, no

sistema linfático, no sistema nervoso central e no caso de mulheres grávidas, por via transplacentária, infecta o feto.

A primeira lesão da infecção sífilítica é uma pápula, também conhecida como “acidente primário”, que se desenvolve no local de inoculação, cerca de 10 a 90 dias (3 semanas) após o contacto inicial (Holmes *et al.* 2008, Larsen *et al.* 1998, Lewis e Young. 2006). Esta pápula geralmente com diâmetro de 0,5 a 1,5cm, após uma semana sofre erosão para úlcera, que se caracteriza por ser redonda ou ligeiramente alongada, firme, indolor, com base limpa e dura à palpação, com um diâmetro de 1 a 2 cm (Figura. 4) (Holmes *et al.* 2008, Castro. 2004). Apesar de ser característico do estágio primário a presença de uma úlcera única no local de inoculação, existem casos, raramente, de doentes com múltiplas lesões neste estágio (Holmes *et al.* 2008).



Figura. 4 – Fotografia de uma lesão de sífilis primária no pénis. Úlcera bem visível, com rebordos redondo e aparência de “botão”.

(Adaptado de Holmes *et al.* 2008)

A úlcera ocorrendo geralmente nas áreas genitais (perineal ou anal) pode contudo, localizar-se em qualquer outra parte do corpo do hospedeiro (Figura. 5). No sexo masculino é mais comum a presença de lesões no pénis, enquanto que no sexo feminino geralmente situam-se na vagina, nos lábios exteriores/interiores e no colo do útero (Holmes *et al.* 2008, Castro. 2004). Nos homens que fazem sexo com homens (HSH), para além das lesões comuns penianas, são frequentemente encontradas lesões anais e orais (LaFond e Lukehart. 2006, Hourihan *et al.* 2004, Mindel *et al.* 1989). No entanto e como referido anteriormente, as

lesões primárias podem ocorrer em qualquer parte do corpo, sendo que quando se verificam em regiões não genitais, podem ter uma aparência atípica, especialmente se for na área anal (Figura. 6) (Holmes *et al.* 2008). De um modo geral, associado à úlcera, observa-se adenopatias regionais não dolorosas, sem flutuação e não aderentes aos planos profundos, e habitualmente não se observam os sintomas sistêmicos.



Figura. 5 – Fotografia de uma lesão sífilítica primária na língua.



Figura. 6 – Fotografia de uma lesão sífilítica primária atípica anal.

(Adaptado de Holmes *et al.* 2008)

A lesão primária desaparece naturalmente num período de 1 a 5 semanas (Larsen *et al.* 1998), independentemente de ter ocorrido terapêutica. Os anticorpos, que são

detetados com os testes serológicos, não treponémicos e treponémicos, geralmente só aparecem entre 1 a 4 semanas após a formação da lesão (Larsen *et al.* 1998).

I.III b. Sífilis Secundária

Algumas semanas ou meses após a sintomatologia da fase primária desaparecer, ou em alguns casos simultaneamente com a cicatrização das lesões primárias, os indivíduos não tratados podem desenvolver doença sistémica, evoluindo para o estágio de sífilis secundária (LaFond e Lukehart. 2006, Holmes *et al.* 2008). Este estágio é caracterizado por uma sintomatologia muito mais extensa e severa que a do estágio primário, devido à disseminação de *T. pallidum* pelo sistema linfático e sanguíneo do hospedeiro, atingindo diferentes órgãos e tecidos. Os sintomas iniciais característicos da sífilis secundária são geralmente sintomas gerais não específicos comuns com os quadros clínicos de outras infeções, tais como febre, sudação profunda, dores de cabeça, dores musculares, artralgias, anorexia, inflamação da orofaringe e das glândulas linfáticas (Larsen *et al.* 1998, Holmes *et al.* 2008, LaFond e Lukehart. 2006, Singh e Romanowski. 1999).

Mais característicos da sífilis secundária são os sintomas relacionados com as lesões da pele e/ou mucosas. As erupções geralmente têm uma aparência polimórfica, podendo ser mais ou menos discretas consoante a progressão da infeção. Inicialmente ocorrem no tronco e nas extremidades do corpo (braços e região palmar, pernas e região plantar) (Figura. 7) (Singh e Romanowski. 1999). Na progressão da infeção, surgem erupções cutâneas de diversas morfologias (LaFond e Lukehart. 2006). Estas geralmente não são pruriginosas, mas são muito variáveis, desde exantema macular (em cerca de 10% dos doentes), maculopapular (cerca de 50% a 70%), papular (cerca de 12%) e anular papular (cerca de 6% a 14%) (Chapel. 1980, Hira *et al.* 1987). As lesões das mucosas são geralmente, superficiais e com úlceras pequenas. Apenas 10% dos doentes com sífilis secundária desenvolvem as lesões conhecidas como *condilomata lata* (LaFond e Lukehart. 2006, Chapel. 1980, Mindel *et al.* 1989). Estas lesões são grandes, esbranquiçadas e extremamente infecciosas, características da sífilis secundária, e localizam-se em áreas húmidas como as zonas genitais, incluindo períneo, ânus e vulva, e axilas (Figura. 8) (Holmes *et al.* 2008, LaFond e Lukehart. 2006).



Figura. 7 – Fotografia de lesão sífilítica secundária no pé e mão.

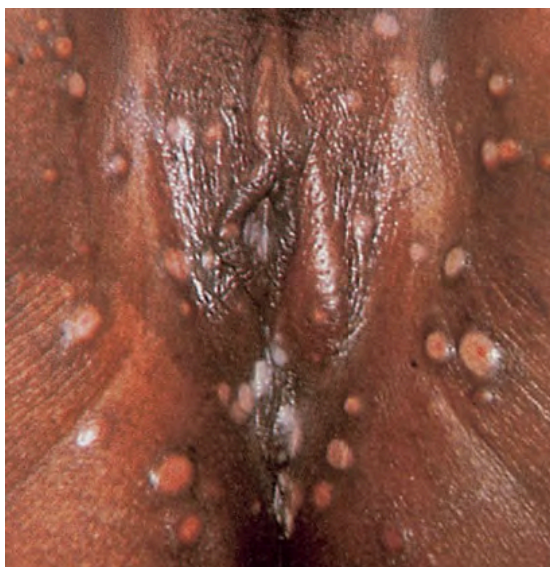


Figura. 8 – Fotografia de lesão típica de sífilis secundária, *condilomata lata* perivulvar e perianal.

(Adaptado de Holmes *et al.* 2008)

Em alguns casos, embora com baixa frequência, a sífilis secundária pode facilitar a lesão hepática originando a hepatite (LaFond e Lukehart. 2006, Mullick *et al.* 2004), e em 80% dos casos são detetados complexos imunes compostos de IgG's e C3, que se depositam nos rins, resultando em lesões renais (Larsen *et al.* 1998). Os sintomas secundários desaparecerão gradualmente, independentemente da administração de terapêutica, e o doente entra na fase de latência. No entanto a infecção pode recidivar, surgindo de novo sintomas de secundarismo (Larsen *et al.* 1998).

I.III c. Sífilis Latente

A sífilis latente é a denominação dada ao estágio assintomático da infecção sífilítica. Por definição os doentes com evidência serológica de sífilis, mas que nunca efetuaram terapêutica ou que não apresentam sintomatologia, são classificados como tendo sífilis latente (Holmes *et al.* 2008).

Os sintomas referidos de sífilis primária e secundária regredem mesmo sem administração de terapêutica, ao fim de 3 a 12 semanas, e o doente pode entrar na fase de latência durante anos sem qualquer sintomatologia (Castro. 2004). Nesta fase, a única evidência de infecção é providenciada pelos resultados reativos dos testes serológicos e independentemente de ser assintomática, a infecção sífilítica continua presente e ativa (Larsen *et al.* 1998). A infecção já não é transmitida sexualmente, mas pode ser transmitida por via transplacentária (Workowski e Bolan. 2015).

A fase de latência é dividida em fase latente precoce (período inferior a um ano após início da doença) e fase latente tardia (período superior a um ano após início da doença), de acordo com as normas do Centro para Prevenção e Controlo de Doenças (CDC) (Larsen *et al.* 1998, CDC. 1991). Esta divisão foi estabelecida sobretudo como auxiliar nas decisões relacionadas com a administração da terapêutica (Castro. 2004). Durante o estágio de latência precoce os testes serológicos não treponémicos são reativos, mas com o prolongar do tempo de latência a reatividade daqueles testes, pode diminuir ou mesmo negativar (Larsen *et al.* 1998). Os doentes na fase de latência precoce têm uma maior probabilidade (25%) de recidivar espontaneamente, do que os doentes em fase de latência tardia (Castro. 2004, Holmes *et al.* 2008). A fase de latência prolonga-se até que seja efetuada terapêutica ou a infecção sífilítica progrida para estágio de sífilis terciária.

I.III d. Sífilis Terciária

A sífilis terciária, ou sífilis tardia, ocorre em cerca de um terço dos casos de doentes não tratados (Larsen *et al.* 1998, Holmes *et al.* 2008). Este estágio apresenta uma sintomatologia mais severa, essencialmente a nível do sistema nervoso central, mas pode também atingir o sistema cardiovascular e/ou outros órgãos. A sífilis tardia pode surgir cerca de 10 a 20 anos após a infecção inicial segundo Larsen *et al.* (1998) e cerca de 20 a 40 anos segundo LaFond e Lukehart (2006). O período específico para o desenvolvimento deste estágio varia consoante os autores, podendo ocorrer vários anos após a infecção inicial e até muito tardiamente no final da vida de um doente (80 ou 90 anos), tendo este tido o contacto inicial aos 20 anos como está documentado (Sacks. 2004).

Com a descoberta dos antibióticos e a criação de uma terapêutica eficaz, atualmente, são raros os casos de sífilis terciária (LaFond e Lukehart. 2006, Holmes *et al.* 2008). Antes da descoberta da penicilina, um terço dos doentes progrediam para sífilis terciária, desenvolvendo neurosífilis (Holmes *et al.* 2008), uma das formas mais comuns de sífilis terciária (Larsen *et al.* 1998). Alguns também desenvolviam doenças cardiovasculares e gommas (Gjestland. 1955), outras duas formas características da fase. Dos doentes com sífilis terciária cerca de 16% desenvolviam sífilis granulomatosa (Chiu e Radolf. 1994), 10% sífilis cardiovascular (Kampmeier. 1972, LaFond e Lukehart. 2006) e cerca de 6,5% neurosífilis (Larsen *et al.* 1998). A sífilis granulomatosa é descrita como sendo semelhante ao granuloma da tuberculose (Larsen *et al.* 1998), podendo ocorrer em diversas partes do corpo incluindo, ossos, pele, mucosas, músculos, olhos e vísceras (Holmes *et al.* 2008). A sífilis cardiovascular é caracterizada por lesões sifilíticas na aorta, em consequência da multiplicação localizada de treponemas (Fitzgerald. 1981), muitas vezes resultando em angina sifilítica (Larsen *et al.* 1998).

Com a terapêutica antibiótica, os casos de sífilis terciária diminuíram, sendo menos que nos séculos anteriores. Atualmente poucos doentes progridem para este estágio, das três lesões mais características da sífilis terciária, a maioria desenvolve neurosífilis. Esta patologia é a mais estudada da fase de sífilis terciária, e a única de verdadeiro interesse em países de alta renda de acordo com Holmes *et al.* (2008).

I.III d.1. Neurosífilis

A neurosífilis é uma neuropatia, que resulta da infecção do sistema nervoso central por *Treponema pallidum*. Ocorrendo após um período alargado, de cerca de 10 a 40 anos após a infecção primária. Esta forma característica de sífilis terciária desenvolve-se em cerca de 25% a 40% dos doentes (Mehrabian *et al.* 2012). Esta patologia é curável, através do uso de antibióticos, desde que seja acompanhada de um diagnóstico precoce, contudo as sequelas originadas por *T. pallidum* não regridem nem revertem (Sacks. 2004). O diagnóstico de neurosífilis é complicado, não só devido à panóplia de sintomas associados à doença que são semelhantes aos de outras doenças, mas também porque pode evoluir de formas distintas (Castro. 2004).

A neurosífilis também pode ser dividida em duas categorias; neurosífilis precoce e neurosífilis tardia (Mehrabian *et al.* 2012). A neurosífilis precoce pode ser assintomática, sendo definida pela presença de alterações do exame citoquímico do líquido cefalorraquidiano (LCR) e na ausência de provas indicativas de doença

neurológica (Holmes *et al.* 2008), sendo o diagnóstico exclusivamente laboratorial (Castro. 2004). Quando sintomática pode manifestar-se com diferentes formas, meningite sífilítica aguda e neurosífilis parenquimatosa (Holmes *et al.* 2008). A primeira geralmente ocorre mais precocemente, sendo uma das primeiras manifestações da infecção do sistema nervoso central (Castro. 2004, Holmes *et al.* 2008). A sua sintomatologia é idêntica à da meningite aguda com episódios de febre alta e persistente, cefaleias moderadas, aumento da pressão intracraniana, paralisia de nervos cranianos, entre outras (Holmes *et al.* 2008). A neurosífilis parenquimatosa resulta da invasão e destruição do tecido nervoso cerebral por *T. pallidum*, pode manifestar-se sob a forma de paralisia geral e de *tabes dorsalis*. A paralisia geral, ou “*dementia paralytica*”, é um processo crónico degenerativo do sistema nervoso central, com evolução lenta que geralmente resulta em morte e associa sintomas psiquiátricos e neurológicos (Castro. 2004). Neste estágio, o processo degenerativo está instalado, não sendo reversível pela administração de terapêutica. A *tabes dorsalis* ocorre na maioria de doentes não tratados, após um período de latência de 20 a 25 anos (Holmes *et al.* 2008) e resulta da lesão dos cordões posteriores da espinal medula e raízes posteriores. A sintomatologia é severa incluindo: dores agudas penetrantes irradiantes geralmente nas extremidades do corpo de curta duração, dormência dos membros inferiores ou tronco e hiperestesia entre outros (Holmes *et al.* 2008).

I.III e. Sífilis Congénita

A sífilis congénita resulta da transmissão de *T. pallidum*, por via transplacentária na mulher infetada, para o seu feto, em qualquer período da gestação. O risco de transmissão vertical é muito mais elevado durante o período de sífilis precoce da progenitora, do que nos estádios mais tardios (LaFond e Lukehart. 2006). Esta infecção congénita é de fácil prevenção, desde que a infecção na grávida seja diagnosticada e tratada. Geralmente a terapêutica no período dos dois primeiros trimestres é suficiente para evitar a transmissão ao feto e todas as lesões características da infecção sífilítica (LaFond e Lukehart. 2006, Sheffield *et al.* 2002). Nos casos em que o tratamento só é administrado após os primeiros dois trimestres ou não é administrado, a infecção poderá resultar na morte prematura do feto, em malformações no seu desenvolvimento e/ou no nascimento de um recém-nascido infetado. Segundo alguns autores é a resposta imunológica do próprio feto, à infecção por *Treponema pallidum*, que origina abortos espontâneos, nados-mortos e/ou prematuridade (LaFond e Lukehart. 2006). Geralmente um

recém-nascido com infecção sífilítica tem sempre um peso inferior ao normal, mesmo durante o período gestacional (Mascola *et al.* 1985).

A sífilis congénita, tal como a sífilis adquirida foi dividida em duas fases; sífilis congénita precoce e sífilis congénita tardia. A primeira relacionada com os dois primeiros anos de vida e a segunda após estes (LaFond e Lukehart. 2006). Os sintomas relacionados com a sífilis congénita precoce são semelhantes aos da sífilis adquirida na fase secundária, aparecendo cerca de 2 a 10 semanas após o parto (LaFond e Lukehart. 2006). Em cerca de 50% dos casos, o primeiro sintoma visível nesta fase é a rinite sífilítica, “snuffles” (LaFond e Lukehart. 2006). Os restantes sintomas variam, desde lesões tecidulares, a *condilomata lata*, por vezes ocorre a descamação da pele nas palmas da mãos e pés e podem aparecer manchas a nível das mucosas (Chawla *et al.* 1985). Alterações como anemia, hepatoesplenomegalia, insuficiência renal, icterícia e osteocondrite podem também ser observadas (LaFond e Lukehart. 2006). A osteocondrite manifesta-se como pseudoparalisia de Parrot’s, na qual a aparente perda de força muscular não ocorre por paralisia verídica, mas resulta das lesões ou fraturas dolorosas, devidas às lesões sífilíticas a nível ósseo (Pereira *et al.* 2017, Rothner e Klein. 1976, Read e Schleiss. 2017, Kocher e Caniza. 1996).

A sífilis congénita tardia, manifesta-se após os dois anos de vida, com sintomas mais severos. Entre os 5 e os 25 anos de idade podem revelar-se patologias graves, tais como neurosífilis sintomática e assintomática, artropatia, articulações de Clutton (inflamação da membrana sinovial) e goma granulomatosa. Característico desta fase da infecção é a tríade de Hutchinson, que engloba os seguintes sinais clínicos: queratite intersticial, perda de audição neurosensorial e malformações dentárias. Algumas destas alterações, mesmo após administração de terapêutica, não só progridem como continuam a manifestar-se (LaFond e Lukehart. 2006).

I.IV Diagnóstico Clínico & Laboratorial

Para o diagnóstico laboratorial de sífilis podem ser utilizados diferentes métodos, consoante o estágio clínico da infecção. Estes métodos variam desde: um exame microscópico direto na presença de lesões, à pesquisa de DNA de *T. pallidum*, a testes serológicos que pesquisam anticorpos. O diagnóstico da sífilis depende da interligação entre os dados clínicos e os laboratoriais, uma vez que ainda não existe nenhum teste que possibilite um diagnóstico definitivo em todos os estádios da doença.

I.IV a. Método de detecção direta de *Treponema pallidum*

O método mais comum de detecção direta de *T. pallidum* é o da microscopia de fundo escuro. É um método antigo e simples, mas considerado extremamente fiável quando efetuado por um microscopista experiente (Saxena. 2004, Wheeler *et al.* 2004, Holmes *et al.* 2008). Em 1909 Coles utilizou a microscopia de fundo escuro para observar *T. pallidum*, assinalando a sua motilidade característica. A partir de 1923, o uso de microscopia de fundo escuro tornou-se sistemático no processo de diagnóstico de rotina da sífilis (Coles. 1909). A microscopia de fundo escuro é a técnica a ser utilizada em casos de lesões sífilíticas primárias, secundárias e congénitas recentes, sendo que um resultado considerado positivo por este método, é indicador de infeção por *Treponema pallidum* (Larsen *et al.* 1998). Um microscopista experiente é capaz de identificar e diferenciar a presença de *T. pallidum*, nas preparações observadas, de outros treponemas, devido às suas características morfológicas e dimensionais (Dyck *et al.* 1999). Para além da sua forma característica em saca-rolhas e a sua peculiar mobilidade com movimentos de rotação, translação e flexão (Dyck *et al.* 1999, Castro. 2004) *T. pallidum* quando visualizado em microscopia de fundo escuro, apresenta uma coloração branca, morfologia de bacilos muito finos helicoidais afunilados nas extremidades e com espiras regulares. Estas são as responsáveis pela sua forma característica em saca-rolhas (Figura. 9) (Dyck *et al.* 1999).



Figura. 9 – Fotografia de *T. pallidum* obtida por microscopia de fundo escuro.

(Adaptado de Awal. 2014)

Esta técnica apesar de fiável, possui algumas limitações, sobretudo relacionadas com a sensibilidade. Um resultado negativo ou positivo não permite excluir ou confirmar

o diagnóstico de sífilis, sem antes, ser confirmado por outra técnica de maior sensibilidade (Dyck *et al.* 1999). Situações como a inexperiência do técnico, administração de terapêutica, diagnóstico incorreto por confusão de patologia e/ou presença de outros treponemas não patogênicos podem estar na origem de resultados imprecisos (Dyck *et al.* 1999, Castro. 2004).

I.IV b. Métodos Serológicos

A serologia, técnica que envolve a pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum*, é considerada um método indireto de diagnóstico, e o mais utilizado no diagnóstico laboratorial da sífilis (Castro *et al.* 2003). Os anticorpos anti-*Treponema* começam a ser detetados no estágio primário, cerca de duas a três semanas após este ocorrer (Castro. 2004). Durante a infecção são produzidos dois tipos de anticorpos, treponémicos e não treponémicos. Os primeiros, anticorpos treponémicos, são anticorpos específicos, enquanto que os segundos, anticorpos não treponémicos, são também conhecidos como fosfolipídicos, cardiolipina e são não específicos. Dois tipos de testes são utilizados para a pesquisa destes anticorpos: os testes treponémicos e os testes não treponémicos (Castro. 2004).

I.IV b.1. Testes Não Treponémicos

Os testes não treponémicos são testes rápidos que detetam anticorpos do tipo IgG e IgM, que são produzidos no hospedeiro, como consequência da invasão pelo *T. pallidum* (Dyck *et al.* 1999). A bactéria, enquanto presente no organismo humano, segrega lipoproteínas e cardiolipina (elementos estruturais) que provocam, por parte do sistema imune do hospedeiro, a produção dos anticorpos de tipo IgG e IgM. Por outro lado, a destruição das células do endotélio vascular, resultante da infecção sífilítica, causa a segregação de substâncias fosfolipídicas que também estimulam a produção desse tipo de anticorpos (Dyck *et al.* 1999, Castro. 2004). Estes são geralmente denominados como “anticorpos anticardiolipina” e são produzidos não só como resposta à infecção por *T. pallidum*, ou por outros treponemas, assim como em resposta a doenças de origem não treponémica, tais como doenças crônicas e/ou agudas que provoquem lesões das células tecidulares (Catterall. 1972, Larsen *et al.* 1998). Por este motivo, um resultado reativo por um teste não treponémico, só por si, não é suficiente para confirmar a infecção sífilítica (Castro. 2004), sendo necessário a confirmação desse resultado por um teste treponémico que pesquise anticorpos específicos. Assim, o resultado do teste não treponémico fica

validado, garantindo-se que não se trata de um resultado falso positivo devido à falta de especificidade do antígeno cardiolipina.

Os testes não treponémicos têm evoluído ao longo dos anos, desde a criação do primeiro teste por Wassermann, Neisser e Bruck em 1906, conhecido como “Wassermann Reaction (WR)”, até ao presente, aspirando sempre aumentar a sensibilidade e especificidade em relação aos testes já disponíveis (Castro. 2004). A evolução dos testes não treponémicos está esquematizada na Tabela 2, enquanto que a relação sensibilidade versus especificidade de alguns testes não treponémicos está ilustrada na Tabela 3.

Tabela 2. Cronologia histórica dos testes não treponémicos.

Data	Autor	Teste
1906	Wassermann, Neisser e Bruck	Teste de fixação de complemento
1907	Michaelis	Teste de precipitação sem complemento
1922	Kahn	Teste de floculação com complemento
1941	Pangborn	Isolamento e purificação da cardiolipina
1946	Harris, Rosenberg e Riedel	Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)
1957	Portnoy, Carson e Smith	Modificação de VDRL para soro não descomplementado (USR)
1961	Portnoy <i>et al.</i>	Modificação do USR para teste rápido em plasma (RPR)
1980	March e Stiles	Teste de rastreio reaginas (RST)
1983	Pettit <i>et al.</i>	Modificação do USR para teste em soro não descomplementado com vermelho de toluidina (TRUST)
1987	Pedersen <i>et al.</i>	Técnica imunoenzimática ELISA

(Adaptado de Larsen *et al.* 1998)

Tabela 3. Comparação da sensibilidade e especificidade dos testes não treponémicos.

Testes	Sensibilidade por estágio de infecção sífilítica (%)				Especificidade (%) Sem Sífilis
	Primária	Secundária	Latente	Terciária	
VDRL	78 (74-87)	100	96 (88-100)	71 (34-94)	98 (96-99)
RPR	86 (77-99)	100	98 (95-100)	73	98 (93-99)
USR	80 (72-88)	100	95 (88-100)	----	99
TRUST	85 (77-86)	100	98 (95-100)	----	99 (98-99)

(Adaptado de Larsen *et al.* 1998)

De um modo geral, os testes não treponémicos têm uma metodologia semelhante, usando como antígeno ativo uma solução alcoólica que contem cardiolipina, colesterol e lecitina, que permite a produção de uma reatividade padrão (Larsen *et al.* 1998, LaFond e Lukehart. 2006).

O teste “*Rapid Plasma Reagin*”, conhecido como RPR, é um teste qualitativo, semi-quantitativo, economicamente acessível, e que permite identificar a presença de infecção sífilítica. Possibilita também avaliar a eficácia da terapêutica, pela diminuição do título de base do soro do doente após terapêutica (Castro *et al.* 2003). O RPR é um dos testes mais utilizados em laboratório (Dyck *et al.* 1999), cujo antígeno é constituído por uma solução alcoólica de cardiolipina, colesterol e lecitina purificada em junção com minúsculas partículas de carvão, que permite a produção de uma reatividade padrão com visualização macroscópica da reação (Larsen *et al.* 1998). Na presença de anticorpos no soro e/ou plasma, estes interligam-se com as partículas lipídicas do antígeno, causando uma aglutinação. As partículas minúsculas de carvão presentes na solução coaglutinam com os anticorpos e formam uma floculação preta. Na ausência de anticorpos no soro e/ou plasma do doente, não ocorre aglutinação (Larsen *et al.* 1998).

Na execução do teste utiliza-se inicialmente o soro e/ou plasma do doente não diluído, para rastreio, com o objetivo de confirmar a presença ou ausência de anticorpos. Quando há um resultado positivo, deve efetuar-se a titulação do soro e/ou plasma executando diluições seriadas até obter uma na qual não ocorra reatividade, anotando-se como título o valor da diluição mais alta onde se observou reatividade (Castro. 2004, Dyck *et al.* 1999). Na utilização deste teste é necessário ter em conta a possibilidade do efeito de “prozona”, que poderá ocorrer em algumas amostras. Este é devido à presença excessiva

de anticorpos numa amostra não diluída a testar, impedindo o equilíbrio da reação antígeno-anticorpo, devido ao bloqueio do antígeno pelo excesso de anticorpos. Nestes casos será necessário proceder com a diluição seriada da amostra até que ocorra reatividade (Dyck *et al.* 1999). Na rotina do laboratório a diluição de 1:16 é geralmente utilizada para detetar este fenómeno (Larsen *et al.* 1998).

I.IV b.2. Testes Treponémicos

Os testes treponémicos pesquisam anticorpos específicos, uma vez que utilizam como antígeno o próprio *Treponema pallidum* ou alguns dos seus componentes (Larsen *et al.* 1998, Castro *et al.* 2001), pelo que permitem confirmar diagnóstico de infeção sífilítica e a reatividade dos testes não treponémicos (Dyck *et al.* 1999). Mais dispendiosos e complexos que os não treponémicos, mantêm-se reativos pelo resto da vida do doente (Holmes *et al.* 2008), não sendo por isso utilizados para avaliar a resposta à terapêutica administrada (Castro. 2004). Contudo, apresentam um grau mais elevado de especificidade e uma maior sensibilidade, que os testes não treponémicos (Dyck *et al.* 1999).

Os testes treponémicos têm evoluído aos longo dos anos, com a criação de novos testes mais específicos e com maior sensibilidade, desde que as primeiras tentativas para utilizar treponemas como antígeno foram concebidas. Em 1949 Nelson e Mayer desenvolveram o primeiro teste para a pesquisa de anticorpos específicos que utilizava treponemas como antígeno, o teste de imobilização (TPI) de *T. pallidum* (Nelson *et al.* 1949, Larsen *et al.* 1998). A evolução dos testes treponémicos está delineada na Tabela 4, enquanto que a relação sensibilidade versus especificidade dos testes treponémicos está ilustrada na Tabela 5.

Tabela 4. Cronologia histórica dos testes treponémicos.

Data	Autor	Teste
1949	Nelson e Mayer	Teste de Imobilização de <i>T. pallidum</i> (TPI)
1953	D'Allesandro e Dardanoni	Teste de fixação de complemento de Rieter
1957	Deacon, Falcone e Harris	Teste de imunofluorescência (FTA)
1964	Hunter, Deacon e Mayer	Teste de imunofluorescência modificado por absorção (FTA-ABS)
1967	Rathlev	Teste de hemaglutinação (TPHA)
1969	Cox <i>et al.</i>	Teste de hemaglutinação em microplaca (MHA-TP)
1975	Veldekamp e Visser	Teste imunoenzimático (ELISA)
1982	Hanff <i>et al.</i>	Aplicação de técnica de Western blot ao diagnóstico de sífilis
1989	Schouls <i>et al.</i>	Utilização dos primeiros antígenos clonados no serodiagnóstico de sífilis

(Adaptado de Larsen *et al.* 1998)

Tabela 5. Comparação da sensibilidade e especificidade dos testes treponémicos.

Testes	Sensibilidade por estágio de infecção sífilítica (%)				Especificidade (%)
	Primária	Secundária	Latente	Terciária	Sem Sífilis
FTA-ABS	84 (70-100)	100	100	96	97 (84-100)
FTA-ABS DS	80 (70-100)	100	100	----	98 (97-100)
MHA-TP	76 (69-90)	100	97 (97-100)	----	99 (98-100)

(Adaptado de Larsen *et al.* 1998)

O teste FTA-ABS foi criado em 1957 por Hunter, Deacon e Mayer, e foi o teste precursor do TPHA (Tabela 4) (Larsen *et al.* 1998). Este teste, tal como o TPHA, é um teste treponémico e por isso utiliza o próprio *T. pallidum* como antígeno e deteta a presença de anticorpos anti-*T. pallidum* (Larsen *et al.* 1998). Após a sua descoberta, este teste passou a ser reconhecido como o teste treponémico standard (Larsen *et al.* 1995). O FTA-ABS, sendo na altura o teste treponémico mais recentemente criado, demonstrou ser muito específico e extremamente eficaz no diagnóstico das fases secundária, tardia e congénita da infecção sífilítica (Knox *et al.* 1966). Este teste baseia-se numa técnica indireta de deteção

de anticorpos via fluorescência, não podendo ser utilizado em amostras de plasma. Para eliminação de reações cruzadas inespecíficas as amostras a estudar devem ser absorvidas em solução contendo treponemas de Reiter. O teste utiliza como antígeno *T. pallidum* estirpe de Nichols fixado em lâmina. Na presença de anticorpos na amostra, estes interligam-se aos antígenos do *T. pallidum* e sendo a reação evidenciada pela utilização de um anticorpo anti-humano conjugado com fluoresceína. O teste é considerado como reativo quando presentes treponemas fluorescentes na observação da lâmina ao microscópio de fluorescência (Larsen *et al.* 1998 a). O FTA-Abs foi frequentemente considerado como o “Gold Standard” (Young. 1998), mas ao longo dos anos novas técnicas foram surgindo. O teste de hemaglutinação, mais conhecido como TPHA (Teste de Hemaglutinação Passiva), deteta a presença de anticorpos produzidos contra os componentes celulares do treponema no plasma ou soro do doente, pela aglutinação direta de eritrócitos sensibilizados pelo antígeno, formando uma malha de eritrócitos (Larsen *et al.* 1998). O teste é constituído por eritrócitos de carneiro sensibilizados com extrato de *Treponema pallidum* estirpe Nichols, que ao interagir com os anticorpos anti-*T. pallidum* presentes aglutinam, sedimentando em tapete homogêneo (Holmes *et al.* 2008). Diversas variações da técnica estão atualmente comercializadas, utilizando eritrócitos de vários animais desde peru, ovelha e galinha (Castro. 2004, Larsen *et al.* 1998). Quando não existe presença dos anticorpos específicos (anti-*Treponema pallidum*), não ocorre aglutinação, e os eritrócitos caem em botão, formando um círculo preenchido muito bem delineado. Em alguns estudos este teste tem sido considerado como o “Gold Standard” (Naidu *et al.* 2012, Montova *et al.* 2006).

As técnicas imunoenzimáticas também são utilizadas para a pesquisa de anticorpos específicos. O teste ELISA foi criado em 1975 por Veldekamp e Visser, sendo mais recente que os testes FTA-Abs e TPHA (Tabela 4) (Larsen *et al.* 1998) e ao contrário daqueles, utiliza antígenos clonados. O primeiro antígeno clonado a ser utilizado no desenvolvimento de um teste serológico deste tipo foi a proteína TmpA (Larsen *et al.* 1998 a). Desde o seu desenvolvimento inicial muitos outros testes utilizando a base da técnica de ELISA foram produzidos, existindo vários kits comerciais no mercado que utilizam DNA recombinante derivado da proteína membrana A (TmpA) do *T. pallidum* como antígeno (Stienstra *et al.* 1992). Estes testes apresentam a vantagem de serem automatizáveis o que permite o estudo de grande número de amostras em simultâneo, apresentando uma especificidade e sensibilidade comparáveis às dos testes FTA-Abs e TPHA (Stienstra *et al.* 1992, Ratnam. 2005).

A técnica de Western Blot desenvolvida por Hanff *et al.* (Tabela 4) (Larsen *et al.* 1998) em 1982, permite detetar a presença de anticorpos do tipo IgG e IgM (Larsen *et al.* 1998 a) nas amostras. Este teste tem sido utilizado, nomeadamente, para detetar presença de anticorpos IgG e/ou IgM anti-*T. pallidum* no soro ou no líquido cefalorraquidiano: para determinar as subclasses do anticorpo IgG na resposta humoral do sistema imune e para a identificação de complexos de resposta imune e os componentes antigénicos (George *et al.* 1991). A técnica está comercializada em Kits, os quais incluem como antígeno proteínas de *T. pallidum* que foram ligadas a tiras de nitrocelulose, as quais são incubadas com o soro da amostra a analisar (Larsen *et al.* 1998 a). A presença de anticorpos específicos é detetada pelo uso de um anticorpo anti-humano marcado com uma enzima e de um substrato específico para a enzima. No estudo efetuado por Marangoni *et al.* (1999), na avaliação da técnica de Western Blot IgG como um teste confirmatório para a fase precoce da sífilis, estes concluíram que o Western Blot demonstrou uma especificidade e sensibilidade de cerca de 100%, tendo sido no seu estudo mais específico e sensível que os testes FTA-ABS e TPHA.

I.IV b.3. Testes Rápidos – Point of Care

Os testes rápidos representam uma nova categoria dentro dos testes serológicos, pois permitem um rastreio de sífilis tanto por testes treponémicos como não treponémicos, em condições adversas e não dependentes de laboratórios. Estes têm de possuir características que sejam compatíveis com os critérios “ASSURED” (Tabela 6), para poderem ser classificados como testes rápidos ou testes “Point-of-Care” (POC).

Tabela 6. Características ideais de um teste rápido: Critério “ASSURED”.

Inglês	Português
A = Affordable (By all who need them)	Barato (distribuição universal)
S = Sensitive (minimum false negatives)	Sensível (mínimo de falsos negativos)
S = Specific (minimum false positives)	Específico (mínimo de falsos positivos)
U = User-friendly (simple to perform, minimal training)	Fácil administração e interpretação
R = Robust (no refrigeration/storage) and Rapid (< 30mins)	Robusto e Rápido
E = Equipment-free	Utilização fácil sem laboratório
D = Deliverable to those who need them	Entrega rápida e imediata de resultados

Adaptado de Peeling *et al.* (2006), citado por Castro e Pereira (2017).

Os testes POC são rápidos por definição, baratos, fáceis de executar e de interpretar, não necessitam de profissionais especificamente treinados, são adequados a centros de saúde de cuidados primários e facultam um resultado muito rapidamente (Castro. 2004).

Nos últimos anos houve um grande investimento na elaboração, divulgação e implementação de testes rápidos de rastreios alternativos aos testes de laboratório, para doenças como HIV, hepatite B e C, sífilis e outras doenças sexualmente transmissíveis e não só (Castro e Pereira. 2017). No caso da sífilis, a maioria dos testes rápidos tipo POC pertencem à classe de testes treponémicos, havendo ainda pouca pesquisa feita no desenvolvimento de testes rápidos não treponémicos. O teste RPR, apesar de ter uma execução relativamente rápida, não é classificado como um teste rápido ou teste Point-of-Care”, pois não cumpre os requisitos necessários do critério “ASSURED” (Castro e Pereira. 2017).

Um dos principais fatores de um teste rápido é a sua capacidade de desempenho em condições ambientais precárias e desfavoráveis, desde calor ao frio extremos, humidade, seca, entre outros, que poderão interferir com a sua validade (Castro e Pereira. 2017). Os testes rápidos têm de funcionar em condições opostas às presentes em laboratórios, de ambientes esterilizados com temperaturas estáveis. A sua utilidade e a razão principal do investimento neste modelo de testes, devem-se à necessidade de providenciar rastreio a populações em locais e áreas sem clínicas, laboratórios e ou hospitais (Castro e Pereira. 2017). Nomeadamente em regiões e países de baixa e média renda, onde a saúde pública não tem as infraestruturas necessárias (Castro e Pereira. 2017).

Para além da sua utilidade no rastreio de campo, em regiões remotas e sem infraestruturas próprias, estes testes têm sido muito utilizados como método de rastreio em unidades móveis, cujo foco são grupos populacionais com acesso limitado às unidades de saúde por motivos económicos e/ou sociais. Os homens que têm sexo com homens (HSH), utilizadores de droga endovenosas, trabalhadores do sexo entre outros, pertencem aos grupos anteriormente mencionados, que têm um maior risco de contraírem alguma doença sexualmente transmissível, incluído a sífilis (Castro e Pereira. 2017). O rastreio precoce nestes grupos representa uma das principais linhas de defesa contra novos surtos de infeção por sífilis.

Tal como referido anteriormente, os testes POC têm de cumprir com o critério “ASSURED” antes de estarem disponíveis para comercialização e ainda assim, vários estudos têm sido feitos, comparando estes testes com os testes clássicos, para avaliar a

sua funcionalidade no contexto não laboratorial e o seu grau de sensibilidade e especificidade (Yue-Ping *et al.* 2013, Leon *et al.* 2015, Zorzi *et al.* 2017). Os estudos diagnósticos utilizando testes POC têm confirmado a sua validade, demonstrando níveis altos de sensibilidade e especificidade e a sua utilidade no campo (Tinajeros *et al.* 2006).

I.IV c. Técnicas de Biologia Molecular

A biologia molecular é um ramo da bioquímica dedicado ao estudo molecular das ligações biológicas dos vários sistemas que constituem a célula, ou seja, dos blocos construtores. Estes incluem as interações entre DNA, RNA, proteínas e a sua síntese (Alberts *et al.* 2008). A evolução desta área científica permitiu o conhecimento, o avanço e a criação de várias novas técnicas que, por sua vez, permitiram o avanço da sociedade humana.

Uma das técnicas de biologia molecular que revolucionou esta área científica foi a reação em cadeia da polimerase, mais conhecida como técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Esta técnica foi desenvolvida em 1983 por Kary Mullis, que idealizou o fundamento da técnica durante a sua rotina diária (Mullis, 1990). Uma ideia que possibilitou a criação de um processo capaz de criar um número ilimitado de cópias de genes (Mullis, 1990).

A técnica de PCR baseia-se na amplificação de um ou mais fragmentos específicos de DNA e/ou RNA gerando inúmeras cópias desse fragmento ou sequência, ou seja, permite a clonagem de sequências de genes e até do genoma completo se for esse o objetivo pretendido. Tendo selecionado a região pretendida para amplificar, com o conjunto de “primers” (sequências de oligonucleótidos complementares à região que se deseja amplificar) *Forward* e *Reverse* específicos, é possível iniciar-se o processo de amplificação. Este processo consiste de três etapas.

A primeira é a desnaturação do DNA, que se pretende amplificar, começando por causar a separação da dupla hélice do mesmo. Este processo utiliza ciclos de altas temperaturas, para que a separação possa ocorrer. A segunda etapa é chamada “annealing”, também conhecida como hibridação, na qual as sequências de oligonucleótidos selecionadas (“primers”) se interligam à região de DNA a amplificar. A terceira etapa é chamada de extensão, inclui também a extensão final, e é responsável pela conclusão da replicação da região alvo e procede à formação da hélice do DNA. Esta etapa é composta por dois ciclos separados a altas temperaturas por períodos variáveis.

Estas três etapas são continuamente repetidas, por ordem, para produzirem mais cadeias de DNA da região alvo (Alberts *et al.* 2008).

Ao longo dos anos diversos artigos têm sido publicados sobre várias técnicas de PCR e do seu potencial como um método de identificação de *Treponema pallidum* e sobre a utilidade e precisão no diagnóstico clínico da sífilis (Smajs *et al.* 2006, Pillay *et al.* 1998). Diferentes ensaios têm sido publicados, variando a investigação desde uma técnica de PCR de Transcrição Reversa utilizando como alvos de amplificação os genes *16S rRNA* e *TpN47* para o estudo de amostras de sangue, lesões e líquido cefalorraquidiano (Centurion-Lara *et al.* 1997), a uma técnica de PCR tendo como alvo uma porção do gene que codifica para a proteína membrana de *47kDa*, para amostras de soro e líquido cefalorraquidiano (Burstain *et al.* 1991) ou a mesma técnica tendo como alvos os genes *TmpA* e *4D* com amostras de líquido cefalorraquidiano (Hay *et al.* 1990), entre muitos outros. Para além do seu potencial como um método de identificação de *T. pallidum*, a técnica de PCR também é útil como um método de subtipagem de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, nos estudos de filogenia e epidemiologia (Katz *et al.* 2010).

A importância da técnica de PCR, especialmente o seu papel no diagnóstico clínico da sífilis, relaciona-se com a sua capacidade em detetar a presença da bactéria nos estádios sintomáticos, mas sobretudo, nos assintomáticos da doença, nos quais não existem manifestações clínicas que alertem para a infeção.

I.V Patogenicidade & Imunidade

Treponema pallidum é uma bactéria com uma elevada capacidade de invasão no hospedeiro, apesar de possuir um baixo nível de toxicidade (Norris *et al.* 2001). Estas características podem estar relacionadas com a ausência de lipopolissacáridos (LPS) (Fraser *et al.* 1998), e a não produção de endotoxinas (LaFond e Lukehart. 2006). Esta bactéria, independentemente da sua fragilidade a fatores ambientais, facilmente origina infeção crónica com diversas manifestações clínicas no hospedeiro. A sua capacidade de invadir e infetar o ser humano – disseminação e colonização – tal como a sua aderência e facilidade na penetração das camadas da epiderme, entre outras barreiras do corpo humano, e a sua capacidade de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, resultam da sua mobilidade característica, em modo “saca-rolhas” (Norris *et al.* 2001, Castro. 2004).

T. pallidum não só é capaz de invadir e colonizar uma grande variedade de tecidos e órgãos do seu hospedeiro, como a sua propagação neste é rápida e vasta. Esta capacidade de disseminação para longe do local primário de infecção resulta nas diversas manifestações clínicas típicas de sífilis, como a sintomatologia associada à sífilis secundária, demonstrando o seu potencial invasivo. Em diversos casos clínicos, detetou-se a presença de *T. pallidum* diretamente em tecidos e fluídos, tal como em lesões terciárias granulomatosas (goma) da pele, localizadas longe da área de infecção inicial (LaFond e Lukehart. 2006, Handsfield *et al.* 1983, Kampmeier. 1964 e Stokes *et al.* 1944).

A primeira etapa da infecção por *Treponema pallidum* é a invasão das células do hospedeiro no local de inoculação. A bactéria é capaz de invadir diversos tipos de células, tais como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, pois possui proteínas de superfície que permitem a sua adesão e ligação às mesmas (LaFond e Lukehart. 2006). A motilidade ativa de *T. pallidum* é crucial para a sua invasão e disseminação no corpo do hospedeiro: cerca de 5-6% do seu genoma é constituído por genes relacionados com a motilidade e quimiotaxia (Holmes *et al.* 2008). O seu movimento característico em “saca-rolhas” permite a penetração das camadas das células epiteliais, assim como das superfícies das mucosas (LaFond e Lukehart. 2006). No local primário de infecção multiplica-se e rapidamente se dissemina via vasos sanguíneos e linfáticos (Hazlett *et al.* 2006). Estudos elaborados em modelos *in vitro*, demonstraram esta bactéria a penetrar células endoteliais em monocamada via junções intercelulares (Holmes *et al.* 2008, Castro. 2004). A penetração interjuncional do endotélio vascular parece ser o motivo pelo o qual, *T. pallidum* se consegue disseminar tão eficientemente (Castro. 2004).

Após a infecção por *T. pallidum*, o sistema imunitário do hospedeiro reage através de mecanismos humorais, que envolvem a produção de anticorpos e mecanismos celulares, que provocam alterações histológicas típicas das lesões sífilíticas (LaFond e Lukehart. 2006, Radolf e Lukehart. 2006). A resposta humoral do sistema imunitário do hospedeiro, é indiciada pela presença de anticorpos de tipo IgG e IgM reativos aos antígenos da superfície da bactéria, com reatividade proporcional ao quadro clínico. Inicialmente, no estágio de sífilis primária recente, predominam na circulação as imunoglobulinas de tipo IgM, que são produzidas em maior quantidade e mais precocemente que as IgG. Após a fase de sífilis primária recente e no decurso da infecção, são as imunoglobulinas de tipo IgG que predominam, sendo produzidas por células imunocompetentes com memória.

Para além da resposta humoral, ocorre também um processo inflamatório tecidual, como resposta celular. A presença da bactéria nos tecidos é a ação-reação que ativa as células imunitárias locais e o seu recrutamento através do sangue periférico (Castro. 2004).

I.VI Transmissão & Epidemiologia

A sífilis é maioritariamente transmitida por via sexual, mas também pode ocorrer transmissão através da transfusão de sangue infetado ou por contacto com sangue infetado (manipulação de amostras biológicas, cortes, entre outros). O risco de transmissão por transfusão de sangue diminuiu consideravelmente devido às normas de segurança, presentes na maioria dos países de alta renda, que efetuam pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* em todos os doadores. A transmissão por via sexual ocorre por contacto direto com lesão sífilítica, exposição às lesões húmidas, cutâneas e/ou mucosas resultantes de sífilis primária ou secundária. A transmissão por via vertical, de mãe infetada para o recém-nascido, originando sífilis congénita é também possível por via transplacentária (Holmes *et al.* 2008, Castro. 2004).

Doentes infetados por *T. pallidum*, sem administração de terapêutica, podem recuperar mas, num período de dois anos, existe a possibilidade de surgirem recidivas e assim transmitir a doença durante esse período. A taxa de aquisição de sífilis por um único contacto sexual com um indivíduo infetado foi estimada em cerca de 30%, com base num estudo da eficácia de vários antibióticos na erradicação da bactéria em doentes com sífilis primária ou secundária, que referiram contacto num período de 30 dias antes (Holmes *et al.* 2008, Schroeter *et al.* 1971). A transmissão vertical, de mãe para o feto, pode ocorrer desde o início da infeção na mãe (Turner *et al.* 1969), tendo sido documentados casos de transmissão vertical às nove semanas de gestação (Harter e Benirschke. 1976, Holmes *et al.* 2008).

Esta infeção, é não só importante pela sua fácil disseminação e capacidade da bactéria infetar qualquer tipo de tecido, mas também porque aumenta a probabilidade de aquisição ou transmissão do vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Jarzebowski *et al.* 2012, Buchacz *et al.* 2004, Fleming e Wasserheit. 1999, Braxton *et al.* 2017).

A sífilis é uma doença com impacto mundial, que durante séculos afetou a população humana, disseminando-se rapidamente de forma silenciosa entre a mesma população. Com a descoberta da penicilina, e devido ao seu potencial como antibiótico e

à sua distribuição mundial em 1940, a terapêutica da sífilis tornou-se possível e o número de casos desta infecção diminuiu drasticamente (Holmes *et al.* 2008).

Relacionado com vários fatores sociais, a incidência da sífilis tem aumentado gradualmente nas últimas duas décadas, tanto em países de baixa e média renda como nos de alta renda. A nível mundial, em 2008, existiam cerca de 36 milhões de pessoas infetadas com *Treponema pallidum* (Rowley *et al.* 2012) e de acordo com um estudo elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem mais de 12 milhões de novos casos de sífilis por ano (Castro. 2004, Smajs *et al.* 2006), sendo esta doença uma das três maiores causas da presença de úlceras genitais no mundo (Smajs *et al.* 2006). Após a descoberta da penicilina e da sua utilização na terapêutica dos casos de infecção por *T. pallidum*, os valores de casos registados diminuíram, até próximo da década de 60, quando se observou um aumento entre toda a população sexualmente ativa, fruto da revolução sexual (Castro. 2004). Nos anos 70 a maior incidência foi sobretudo registada entre a população HSH (Castro. 2004). Sendo de referir que nos anos 80 o número de casos nesta população diminuiu, devido ao surto de SIDA, que alterou os comportamentos sexuais de risco (Castro. 2004).

Nos Estados Unidos entre 2000 a 2004, observou-se um aumento de casos de sífilis primária e secundária, de 7% em 2000 para 64% de casos em 2004, sobretudo associados à população de HSH (CDC. 2012).

Cerca de 75% dos novos casos de doença nos Estados Unidos da América, tanto na fase primária como secundária, foram observados neste grupo e a prevalência continua a aumentar (CDC. 2014). Nos anos de 2000 a 2016 o aumento na taxa de incidência de infecção sífilítica resultou do maior número de casos observados entre homens, mais especificamente entre HSH (Braxton *et al.* 2017). Em algumas áreas urbanas a frequência de coinfeção HIV *T. pallidum* na população HSH está estimada entre os 20% a 70% (Smajs *et al.* 2006).

Os estudos epidemiológicos realizados pelo Centre for Disease Control and Prevention (CDC), ao longo da última década, indicam um número crescente de diagnósticos de infeções por *T. pallidum* de ano para ano, especialmente no primeiro e segundo estádios. Entre 2014 e 2015, na América, registou-se a nível nacional um aumento de casos de sífilis primária e secundária em todas as faixas etárias dos 15 aos 64 anos, englobando todas as raças/etnicidades (Barton *et al.* 2016). Nesse ano, 2015, o CDC registou 23 872 casos de sífilis, correspondendo a um aumento de 19% de casos de 2014

para 2015, o que resultou em 7,5 casos por 100 000 indivíduos, o valor mais elevado desde 1994 (Barton *et al.* 2016). Como já foi referido, o aumento no número de casos desta infeção tem sido entre homens, sobretudo na população HSH, na qual o número de infeções tem aumentado de modo contínuo desde 2000. No período de 2014 a 2015 o aumento entre homens foi 18%, tendo-se registado em 2015 23 872 casos de sífilis, dos quais 14 229 ocorreram na população HSH (Barton *et al.* 2016). No total de casos registados entre homens (17 407), cerca de 81,7% ocorreram na população HSH (Barton *et al.* 2016).

No decorrer de 2015, também se registou um aumento de casos na população feminina, (27,3%) com consequente aumento no número de casos de sífilis congénita (Barton *et al.* 2016), uma vez que o número de casos de sífilis congénita é proporcional ao aumento do número de casos na população feminina (Barton *et al.* 2016). Com bases nos relatórios efetuados pelo CDC, estima-se que cerca de 40% dos casos de grávidas infetadas resulta em morte perinatal (Barton *et al.* 2016), sendo a sífilis congénita a causa mais comum de mortalidade perinatal (Stamm. 2010).

Um dos maiores problemas desta infeção é a grande percentagem de indivíduos que são assintomáticos nas primeiras fases da doença, cerca de 50% a 80% das mulheres infetadas não apresentam sintomas. Consequentemente não procuram aconselhamento médico, não são diagnosticadas ou tratadas, aumentando a probabilidade de transmissão (World Youth Report 2003. 2004).

Na Europa, entre 2004 e 2013, foram observados aproximadamente 204 252 casos de sífilis em 30 países, e desde 2010 a incidência aumentou entre a população masculina e decresceu na feminina (ECDC. 2015). Em 2013 foram notificados 22 237 casos de sífilis em 29 países, com 62% dos casos tendo origem em quatro deles (Alemanha, Roménia, Espanha e Reino Unido). Em Portugal, tal como noutros quatro países Europeus (Croácia, Chipre, Islândia e Eslovênia), a taxa de incidência foi inferior a 2,5 por 100 000 habitantes (ECDC. 2015). Em 2013, a maioria dos casos registados na Europa, foram observados em indivíduos da faixa etária dos 25 aos 34 anos, cerca de 30%; na faixa dos 45 anos apenas 29%, e dos 35 aos 44 anos cerca de 27% de casos. Relativamente a estes casos 58% foram diagnosticados no grupo HSH, 36% em heterossexuais e em 7% não havia informação (ECDC. 2015). Tanto Portugal como a Eslovénia foram os países na União Europeia que notificaram a maioria dos casos de sífilis primária em 2013. De acordo com os dados estatísticos do European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC (2015) registou-se um grande aumento de casos de sífilis entre a população HSH, enquanto o

inverso ocorreu entre os indivíduos heterossexuais. Segundo aquele organismo o incremento naquela população poderia ser atribuído a mudanças nas práticas sexuais da mesma população na qual, durante o mesmo período, foi também observado (ECDC. 2015) aumento de outras infecções sexualmente transmissíveis, como o HIV e a gonorreia (ECDC. 2015, ECDC. 2014).

Na Figura 10 é possível observar o aumento e diminuição de novos casos registados de sífilis na União Europeia, relativo ao período de 2008 a 2013. A Figura 11 demonstra a evolução do número de novos casos de sífilis notificados em Portugal ao longo de seis décadas, desde 1950 até 2015.

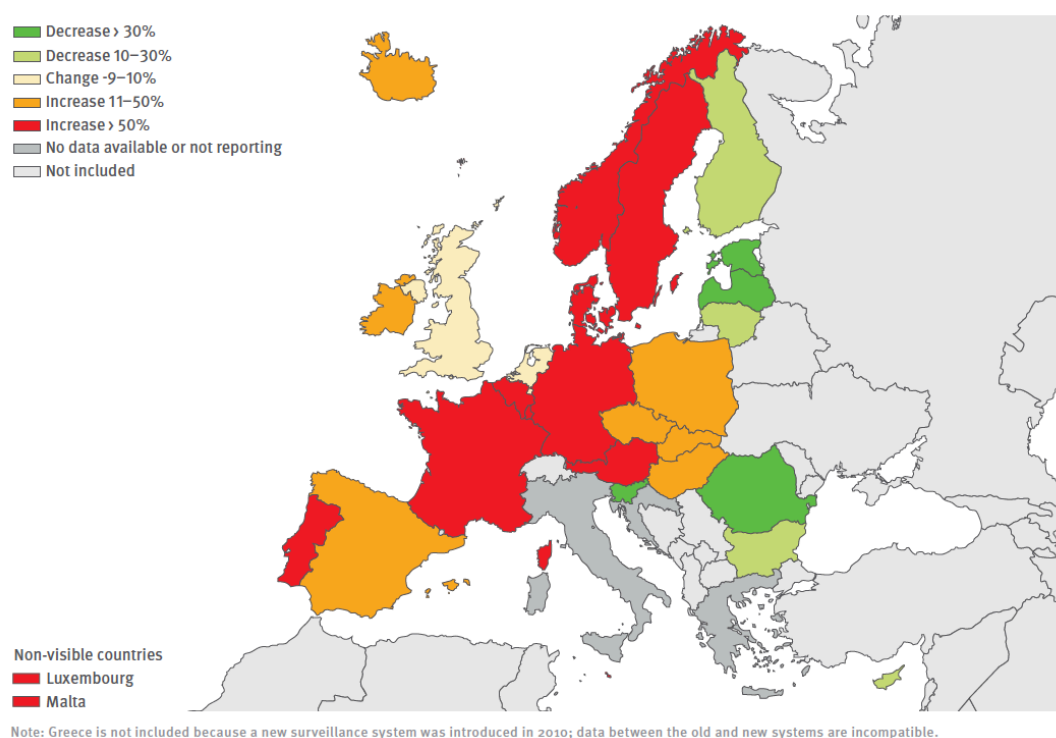


Figura. 10 – Mapa da União Europeia, ilustrando o aumento e diminuição de novos casos de sífilis registados durante o período de 2008 a 2013.

(Adaptado de ECDC. 2015)

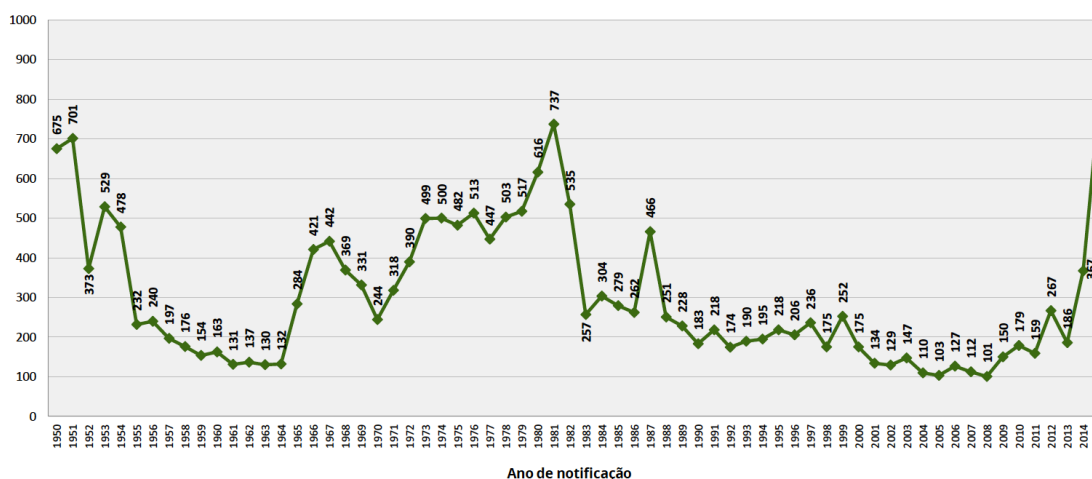


Figura. 11 – Número de casos novos de sífilis notificados por ano, em Portugal desde 1950 até 2015.

(Adaptado de Pinto *et al.* 2016)

I.VI a. População HSH

O número de casos novos registados tanto pelo CDC como pelo ECDC têm aumentado continuamente entre a população HSH (homens que têm sexo com homens) (ECDC. 2018, Braxton *et al.* 2017). O CDC registou que o aumento contínuo de novos casos de sífilis reportados entre 2000 a 2016, foram primariamente atribuídos a um aumento no número de casos na população masculina, particularmente no grupo de risco HSH (incluindo também a população bissexual) (Braxton *et al.* 2017). Tal como observado em anos anteriores, em 2016, os novos casos de sífilis primária e secundária registados pelo CDC na América foram também, maioritariamente atribuídos à população HSH (Braxton *et al.* 2017).

O ECDC reportou, no relatório anual epidemiológico referente ao ano 2016, mais de 29 mil casos novos de sífilis na União Europeia, com uma taxa de incidência de 6,1 casos por 100 mil pessoas. Nestes verificou-se um rácio oito vezes superior na população masculina em relação à população feminina e cerca de 66% dos casos registados, foram atribuídos ao grupo de risco HSH (ECDC. 2018). Desde 2011 é possível observar um aumento ininterrupto de novos casos de sífilis, especialmente na população masculina, devido predominantemente a um aumento de casos entre homens que têm sexo com homens (ECDC. 2018). Em 2016 os países europeus com incidências mais elevadas foram a Inglaterra, Malta, Islândia e Alemanha com taxas de incidência a rondar os 8,7 a 9,9 casos por 100 mil pessoas (ECDC. 2018).

Em Portugal, a Direção Geral de Saúde registou um aumento contínuo de novos casos de sífilis desde 2012 a 2015, tendo sido reportados 791 casos de sífilis em 2015. Destes casos, cerca de 600 foram identificados na população masculina (Pinto *et al.* 2016). O Instituto Nacional de Estatística (INE) português documentou, relativamente ao ano 2016, cerca de 7,5 casos novos de sífilis por 100 mil pessoas (INE. 2018), enquanto que o ECDC, no mesmo ano, registou cerca de 705 casos de sífilis em Portugal, valores mais elevados do que os observados em anos anteriores por este organismo (ECDC. 2018).

I.VII Tratamento & Prevenção

A sífilis, desde que tratada precocemente nos primeiros estádios antes da instalação das lesões de sífilis tardia, é curável. Nos casos mais severos de sífilis, em fase terciária, a administração de antibióticos tem de ser efetuada por um período mais extenso (Holmes *et al.* 2008, Workowski e Bolan. 2015).

Os primeiros tratamentos descobertos utilizados para a terapêutica da infeção por *T. pallidum* foram à base do mercúrio e de guaiacum. O mercúrio já há muito que era utilizado no tratamento de doenças de pele e até da lepra, especialmente pelos povos Árabes. No início do século XVI a terapêutica mais utilizada era feita à base do mercúrio por administração externa, na forma de pomadas, sendo no fim do século XVIII adaptado para administração por via retal e/ou oral por pastilhas (Parascandola. 2007, Quézel. 1992 a). Um outro tratamento tão popular como o mercúrio e igualmente recomendado, foi o guaiacum – uma madeira nativa do continente Americano – que foi muito utilizada no início do século XV tanto por Portugueses como Espanhóis. A madeira era macerada até ficar em pó e depois fervida em água, e o líquido resultante da fervura, após removida a madeira, era ingerido pelos doentes. Em associação com esta preparação eram também administrados aos doentes laxantes ligeiros e efetuadas saunas. Esta terapêutica tinha uma duração de 30 dias (Parascandola. 2007).

No século XIX novos tratamentos foram introduzidos, à base de iodeto de potássio e arsénio, mas não tiveram muito sucesso e não conseguiram competir com a popularidade do uso do mercúrio, o qual foi utilizado até ao início do século XX (Parascandola. 2007, Quézel. 1992 b). Em 1910, Paul Ehrlich desenvolveu uma nova droga (diáxidiâmidoarsenobenzol) a que chama Salvarsan – popularmente conhecida como a “bala mágica” – um composto derivado do arsénio, que era eficaz contra *Treponema*

pallidum, apesar do seu tratamento ser longo e causar diversos efeitos secundários (Castro. 2004, Frith. 2012). Após o Salvarsan, foram formulados outros compostos, também à base de arsénio, como o Neosalvarsan entre outros, com a esperança de melhorar os efeitos secundários tóxicos da terapêutica. Apesar desses efeitos secundários, as terapêuticas à base de compostos derivados do arsénio, mantiveram-se como as mais eficazes na luta contra a sífilis, até à descoberta da penicilina. A eficácia da penicilina na terapêutica desta infeção só foi descoberta nos anos 40, revolucionando o tratamento da doença (Parascandola. 2007). Após a sua descoberta, foram elaborados diversos estudos clínicos para testar a sua eficácia em doentes com sífilis, tendo os resultados sido extremamente favoráveis. A penicilina rapidamente foi aceite como sendo o tratamento mais eficaz para a terapêutica desta infeção (Parascandola. 2007, Richards. 1946, Mahoney *et al.* 1994, Moore *et al.* 1944).

O antibiótico de eleição para qualquer uma das fases da sífilis é a Penicilina G, que pode ter diferentes preparações (benzatina, procaína, entre outras). A dosagem e o período de tratamento diferem consoante a fase da infeção e a sintomatologia associada. O tratamento da sífilis latente, tardia e terciária, requer uma duração muito maior devido não só à sintomatologia mais severa como também às sequelas presentes (Workowski e Bolan. 2015).

Nos estádios precoces geralmente está recomendado uma injeção intramuscular, em dose única com 2,4 milhões de unidades, de benzilpenicilina benzatina (benzilpenicilina G) de longa duração (Holmes *et al.* 2008), que se mantém por um período de três semanas (Castro. 2004). Para os doentes alérgicos à penicilina ou em que a administração seja impossível por outros motivos, na terapêutica pode ser utilizada ceftriaxona 1g por via intravenosa ou intramuscular uma vez por dia durante 10 dias (Holmes *et al.* 2008, Marra *et al.* 2000, Zhou *et al.* 2005). Outro antibiótico, a doxiciclina (100mg 2 vezes por dia) com uma duração de 14 dias, é também utilizado na terapêutica da infeção (Ghanem *et al.* 2006). Para além destes antibióticos, a azitromicina provou ser eficaz na sífilis primária e secundária (Hook *et al.* 2002, Riedner *et al.* 2005), com uma dosagem baixa (cerca de 1 a 2g) mesmo em doentes com coinfeção por HIV (Holmes *et al.* 2008, Kiddugavu *et al.* 2005). Contudo foram já documentadas alterações cromossómicas em *T. pallidum* relacionadas com resistência à azitromicina e insucesso terapêutico com este antibiótico, pelo que este não deve ser utilizado como terapêutica de primeira linha (Workowski e Bolan. 2015).

No caso de sífilis latente precoce o tratamento recomendado pelas normas do CDC, é a de 2,4 milhões de unidades (MU) injetável em dose única, enquanto que em doentes com sífilis latente tardia ou cuja duração seja desconhecida, o uso de 7,2 MU, divididas em 3 doses de 2,4 MU por semana durante três semanas consecutivas (Workowski e Berman. 2006). Em relação a doentes com neurosífilis está recomendado efetuar a terapêutica intravenosa de penicilina aquosa G 18-24 MU por um período de 10 a 14 dias ou terapêutica intramuscular de procaína-penicilina G 2,4 MU associada a 500mg de probenecida por via oral, 4 vezes por dia por um período idêntico (Workowski e Berman. 2006). Na grávida com sífilis primária ou secundária a terapêutica é igual à anteriormente referida para estes estádios. Em relação às doentes grávidas alérgicas à penicilina, independentemente do estágio da infeção em que se encontrem, o tratamento indicado pelo CDC continua a ser a penicilina. Sendo recomendado que estas doentes sejam dessensibilizadas por via oral ou intravenosa, um processo relativamente rápido que demora entre 4 a 12 horas, após o qual se administra a primeira dose do antibiótico (Workowski e Bolan. 2015).

As medidas preventivas em relação com infeção por *T. pallidum* são maioritariamente baseadas na divulgação da doença e dos fatores de risco a ela associados, uma vez que ainda não existem quaisquer medicamentos profiláticos ou vacinas que previnam o desenvolvimento desta doença. Nomeadamente, a divulgação dos sintomas iniciais como o aparecimento de lesões/úlceras entre outros; procurar aconselhamento médico em caso de desconforto; evitar comportamentos de risco como múltiplas relações desprotegidas. Na nossa sociedade é vital que seja reforçada a consciencialização da importância das doenças sexualmente transmissíveis, do seu impacto, assim como deve ser incentivada a adoção de medidas preventivas e a preocupação acrescida da população em relação ao rastreio regular.

A promoção do conhecimento desta doença, que ainda não foi erradicada, é necessária, reforçando-se ao mesmo tempo um apelo à população para ser vigilante, praticar sexo seguro independentemente da orientação sexual, devendo efetuar rastreios regularmente, especialmente em caso de suspeita de infeção. A frequência e prática de rastreio é o elo determinante para a prevenção da sífilis congénita e a diminuição da sua transmissão.

I.VIII – Objetivos do Estudo & Justificação da Tese

O diagnóstico da infeção por *Treponema pallidum* é baseado na correlação entre a clínica e o diagnóstico laboratorial particularmente pela pesquisa de anticorpos, sendo sobretudo complicado no estágio latente em que os doentes estão assintomáticos. Infelizmente a serologia não é suficientemente sensível e específica para um diagnóstico laboratorial preciso em todos os estádios da infeção, e ainda não existe um sistema de cultura “in vitro”, para o isolamento deste microrganismo.

Por estas razões têm sido desenvolvidas técnicas de biologia molecular, numa tentativa de auxiliar o diagnóstico e melhorar o conhecimento epidemiológico da sífilis. Existem diversas técnicas de PCR - PCR Multiplex, PCR em Tempo Real, entre outras – com base em diferentes metodologias e que usam diferentes genes alvo de amplificação que permitem detetar DNA de *T. pallidum*, que podem ser um auxiliar no diagnóstico laboratorial desta infeção.

O objetivo geral desta tese é avaliar diversas técnicas para o diagnóstico da infeção por *T. pallidum*, incluindo testes rápidos e técnicas de PCR.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar o valor diagnóstico dos testes serológicos RPR, TPHA e Determine.
- Comparar uma técnica de PCR em Tempo Real (PCR-TR) com uma técnica de PCR-Multiplex (PCR-M) em amostras de sangue e de lesões.

II. Materiais & Métodos

As amostras utilizadas para este estudo provieram de utentes de uma clínica de rastreio de IST para HSH – CheckPoint de Lisboa. Após esclarecimento e obtenção do consentimento informado, foram colhidas amostras de sangue nas quais se efetuou o rastreio de anticorpos anti-*T. pallidum* através de um teste rápido treponémico (Determine). Nos utentes com lesões suspeitas de infeção por *T. pallidum* foi colhido exsudado.

As amostras de sangue foram colocadas em tubos contendo EDTA para obtenção de plasma e os exsudados em tubos de 1,5ml contendo PBS estéril. As amostras foram de seguida transportadas para o laboratório de DST do IHMT, onde foram efetuadas as técnicas descritas em seguida.

No total foram estudadas 713 amostras provenientes de 689 utentes, tendo-se obtido em 25 amostras de sangue e lesão, em 663 apenas amostras de sangue e em 25 exclusivamente amostras de lesões.

II.I Testes serológicos – Pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum*

A pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum* foi efetuada em amostras de plasma por um teste não treponémico e um teste treponémico. As amostras de plasma foram obtidas a partir das de sangue total com EDTA, sendo aquele colocado em tubos eppendorfs de 1,5ml, que após estudado foi conservado a -20°C.

II.I a. Teste Não Treponémico

O teste não treponémico, utilizado no estudo foi o teste RPR – *Macro-Vue RPR Card Test* – que tem como antigénio ativo uma solução alcoólica que contem cardiolipina, colesterol e lecitina, que permite a produção de uma reatividade padrão.

Todas as amostras foram estudadas por este teste segundo o protocolo da casa comercial. Para a execução do mesmo pipetou-se 50µl da amostra de plasma para o interior de um círculo do cartão “Macro-Vue Card Test”, previamente legendado com a identificação da mesma, cada amostra para um círculo diferente. Com a parte achatada da pipeta, fornecida pelo kit, espalhou-se a amostra uniformemente pelo interior do

círculo. Após agitação da suspensão do antígeno, durante 10 a 15 segundos, colocou-se 16µl sobre cada amostra. A leitura do resultado foi efetuada após a agitação do cartão num agitador rotatório automático a 100 rpm durante 8 minutos, sob uma boa fonte luminosa.

Um resultado foi considerado reativo sempre que se observou, aglutinação (floculação) no interior do círculo, e não reativo na sua ausência. Um exemplo ilustrativo de resultados reativos, moderadamente reativos e não reativos podem ser visualizados na Figura 12.

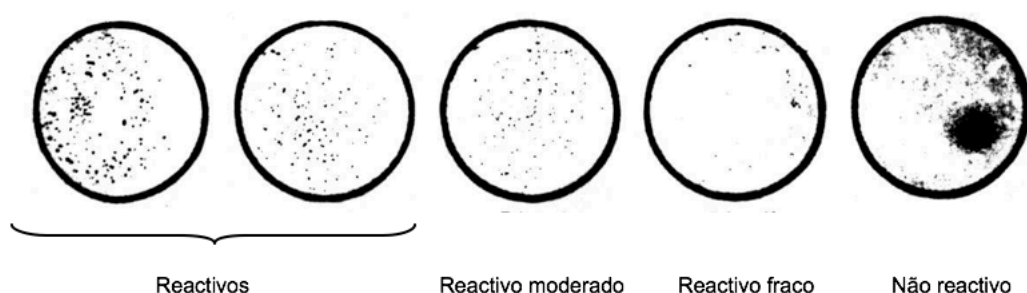


Figura. 12 – Exemplo ilustrativo de resultados reativos, moderadamente reativos e não reativos de um teste RPR.

Todas as amostras reativas foram tituladas efetuando-se diluições seriadas de fator 2 da mesma, até se atingir um ponto final, sem aglutinação, sendo o título determinado pela última diluição que apresentou aglutinação.

Para a obtenção do título pipetou-se 50µl de soro fisiológico para cada um dos círculos do cartão. No primeiro círculo adicionou-se 50µl da amostra de plasma a estudar, homogeneizou-se com a pipeta e transferiu-se 50µl para o segundo círculo. Neste e após homogeneizar-se, transferiu-se outros 50µl para o terceiro círculo, e assim sucessivamente até ao último círculo onde, após a homogeneização, se descartou os 50µl finais. Desta forma obtiveram-se as diluições de: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e sucessivamente. Depois de espalhar cada uma das diluições adicionou-se uma gota da suspensão do antígeno (16µl) em cada círculo, colocou-se o cartão no agitador automático a 100 rpm durante 8 minutos. A última amostra em que se observou aglutinação (floculação) foi considerada como o título da amostra em estudo.

Um exemplo ilustrativo de diluições sucessivas, e como determinar o título da infecção pode ser visualizado nas Figuras 13 e 14.

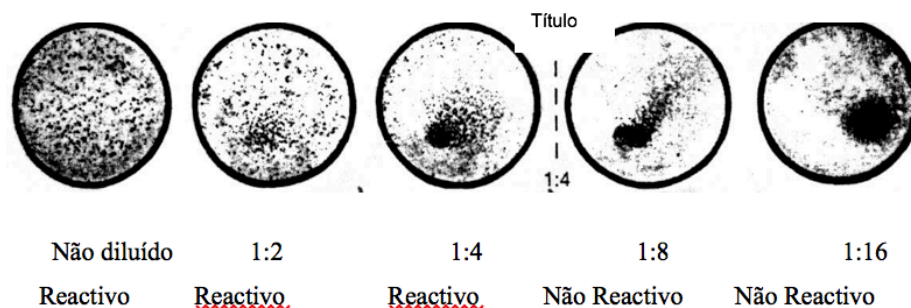


Figura. 13 – Esquema das diluições efetuadas para titular uma amostra reativa pela avaliação qualitativa, título do doente 1:4.

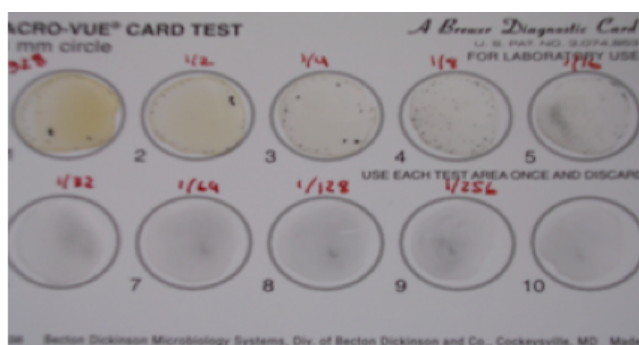


Figura. 14 – Ilustração do teste RPR num cartão Macro-Vue com as diluições seriadas da amostra de plasma de um doente.

II.I b.1. Teste Treponémico – TPHA

Todas as amostras de sangue foram também estudadas pelo teste treponémico de hemaglutinação – “TPHA 200 Test Kit” da Fortress Diagnostics – o qual utiliza como antígeno eritrócitos de carneiro sensibilizados com extrato de *Treponema pallidum* estirpe de Nichols. Na presença de anticorpos na amostra do doente os eritrócitos sensibilizados pelo antígeno aglutinam, formando uma malha que sedimenta em tapete homogêneo no poço da microplaca. Quando não existe presença de anticorpos específicos não ocorre aglutinação e os eritrócitos sedimentam em forma de botão, formando um círculo preenchido muito bem delineado. Para a execução do teste seguiu-se o protocolo fornecido pela casa comercial.

Inicialmente adicionou-se 190µl de diluente ao primeiro poço da microplaca de cada linha, consoante o número de amostras estudadas, adicionando-se em seguida 10µl de plasma de cada amostra a testar, homogeneizando-se. Da diluição assim efetuada, removeu-se 25µl do poço 1, colocou-se no poço 2 e outros 25µl no poço 3. De seguida, após agitação das respetivas suspensões, adicionou-se 75µl de células controlo (CC) (eritrócitos não sensibilizados) ao poço 2 e 75µl de células teste (CT) (eritrócitos sensibilizados) ao poço 3. De seguida pipetou-se 75µl do reagente CC para os poços 4 e 6 e 75µl do reagente CT para os poços 5 e 7. Tendo-se adicionado 25µl do controlo positivo aos poços 4 e 5 e 25µl do controlo negativo aos poços 6 e 7. Estes servem como controlos do teste sendo necessários para validar os resultados obtidos com as amostras.

Após concluir este último passo, deixou-se repousar a microplaca à temperatura ambiente, durante um período de 1 hora, após o que se realizou a leitura dos resultados para cada uma das amostras estudadas. Um exemplo ilustrativo esquemático da organização e distribuição dos reagentes na placa de microtitulação pode ser visualizado nas Figuras 15 e 16.

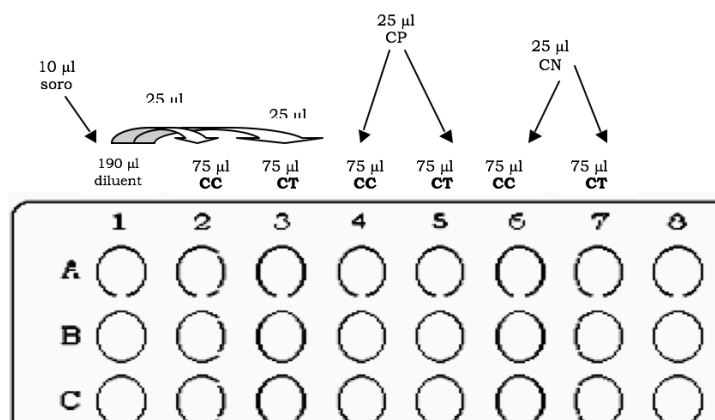


Figura. 15 – Esquema da organização e distribuição dos reagentes pela placa de microtitulação.

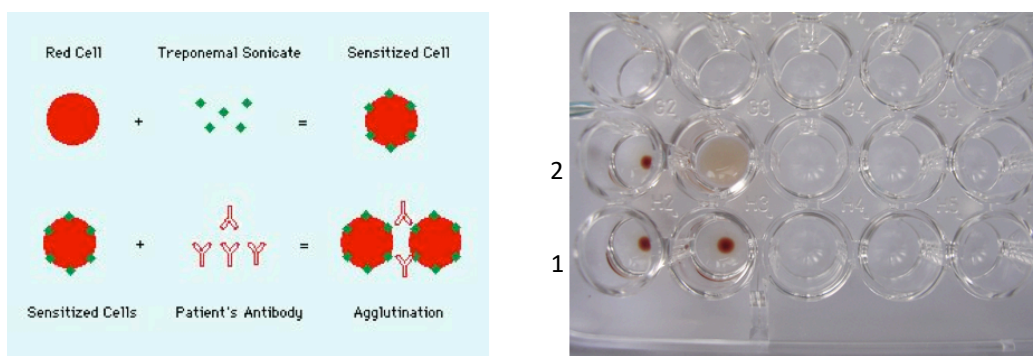


Figura. 16 – Esquema da reação de aglutinação entre eritrócitos sensibilizados na presença e na ausência de anticorpos anti-*T. pallidum*. 1 resultado não reativo 2 resultado reativo.

Foram considerados reativos todos os resultados onde se observou a formação de um tapete homogêneo no poço da microplaca correspondendo a hemaglutinação. Os resultados não reativos foram determinados pela ausência de hemaglutinação e correspondendo à formação de um botão de eritrócitos, bem delineado no centro do poço.

II.I b.2. Teste Treponémico – Anti-Sífilis

Todas as amostras com resultados divergentes entre o teste TPHA e o teste rápido *Determine*, foram analisadas por outro teste rápido treponémico da marca Laboquick, o teste *Anti-Sífilis*.

Utilizando a pipeta fornecida pelo kit, adicionou-se uma gota da amostra de plasma, aproximadamente 50µl, à área assinalada por “S” do dispositivo do teste e deixou-se repousar por 10 minutos, após o que se efetuou a leitura do teste. O aparecimento de uma linha na zona “C” (Controlo) do dispositivo, permite a validação do teste, na sua ausência o resultado não é aceite. Um teste é considerado reativo quando há formação de uma linha na zona “C” e outra na zona do dispositivo designada por “T” (Teste). O resultado é considerado não reativo quando apenas existe formação de linha na zona “C”.

A Figura 17 ilustra dois testes rápidos *Anti-Sífilis*, utilizados para confirmar duas amostras diferentes, sendo uma reativa e outra não reativa.

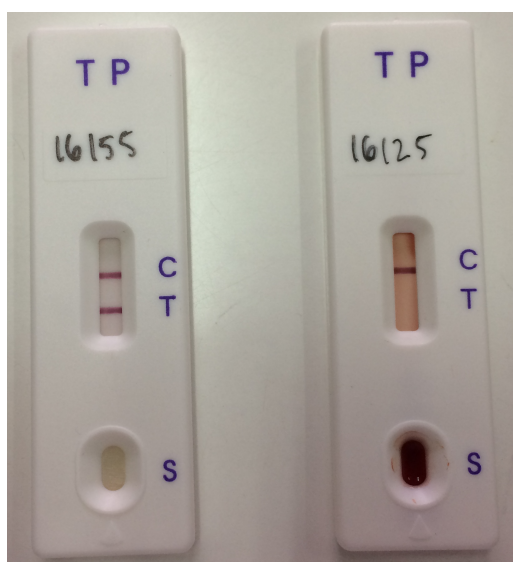


Figura. 17 – Teste rápido *Anti-Sífilis* da Laboquick. À esquerda: Teste reativo com duas linhas, Controlo e Teste. À direita: Teste rápido não reativo, apenas linha Controlo.

II.I b.3. Teste Treponémico – Determine

Como referido anteriormente, o rastreio das amostras provenientes de utentes da clínica CheckPoint de Lisboa, foi efetuado no local pelo teste rápido treponémico *Determine*.

Utilizando a pipeta fornecida pelo kit, adiciona-se uma gota da amostra, aproximadamente 50µl, à área absorvente do teste e após 1 minuto adiciona-se 1 gota do tampão “Chase” fornecido no kit. Deixa-se repousar durante um período de 15 minutos, após o qual se efetua a leitura do teste. O aparecimento de uma linha na área denominada de “Controlo” na banda do dispositivo, permite a validação do teste, na sua ausência o resultado não é aceite. Um teste é considerado reativo quando há formação de uma linha na área “Controlo” e outra na área da banda do dispositivo denominada “Paciente”. O resultado é considerado não reativo quando apenas existe formação de uma linha na área “Controlo” (Alere. 2013).

A Figura 18 ilustra passo a passo a metodologia do teste rápido *Determine*, incluindo como efetuar a leitura do mesmo com resultados reativos, não reativos e inválidos.

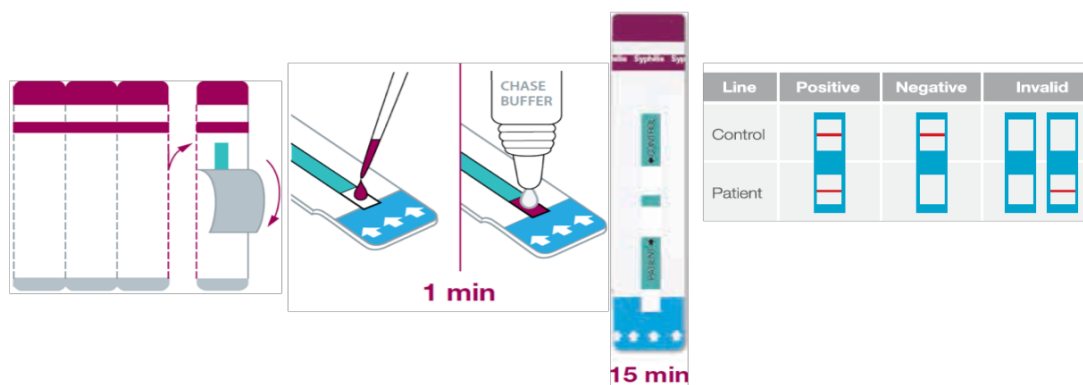


Figura. 18 – Ilustração passo a passo da metodologia do teste rápido *Determine* da Alere, incluindo um guia de interpretação de resultados.

(Adaptado de Alere. 2013)

II.II Pesquisa de DNA de *Treponema pallidum*

A pesquisa de DNA de *Treponema pallidum* foi efetuada em 217 amostras de sangue de indivíduos com teste de RPR superior ou igual a 1:4, e em 50 amostras de exsudados de lesões. Estas amostras foram testadas através de duas técnicas de PCR: PCR-Multiplex e PCR em Tempo Real.

II.II a. Extração de DNA Total

Inicialmente efetuou-se a extração de DNA utilizando o Kit Comercial – QIAamp DNA Blood Kit – da Qiagen, que permite uma extração e purificação do material genético presente nas amostras (Figura. 19). Neste método foram seguidas as instruções da casa comercial, tendo-se efetuado alguns ensaios, usando como referência o controlo positivo, com o objetivo de otimizar a técnica para as amostras de sangue total e plasma.

Inicialmente adicionou-se a um tubo de microcentrifuga de 1,5ml, 400µl de Tampão AL mais 40µl de Proteinase K e finalmente 400µl de amostra, seja esta de sangue total, de plasma ou de soro. De seguida, a mistura foi homogeneizada no vórtex durante 15 segundos e incubada a 56°C por um período de 4 horas ou durante a noite no caso das amostras de sangue total, e por um período de 30 minutos a 1 hora no caso das amostras de plasma e soro. A diferença no tempo de incubação entre as amostras de sangue total e soro ou plasma é devido ao grau de pureza, à sua consistência e à quantidade de resíduos presentes nas amostras. A composição das amostras de soro e plasma é maioritariamente água (93%), os restantes 7% são constituídos por hormonas, anticorpos, glucose, nutrientes, entre outros, sendo a única diferença a presença de fatores coagulantes no plasma. As amostras de plasma e soro são mais puras (composição mais leve à base de água), com uma consistência mais solúvel que o sangue, devido à ausência de eritrócitos e células brancas e, por isso, necessitam menos tempo de incubação (Maton *et al.* 1993).

Concluído o tempo de incubação, realizou-se uma breve centrifugação das amostras para remover quaisquer gotas presentes, resultantes da condensação, nas tampas dos tubos de microcentrifuga. De seguida adicionou-se ao tubo de microcentrifuga 400µl de etanol absoluto, misturando no vórtex por 15 segundos. Depois da solução estar homogeneizada, deixou-se repousar durante 5 minutos, após o que se transferiu cuidadosamente sem molhar o bordo, para uma coluna “Spin QIAamp” previamente colocada num tubo coletor de 2ml, e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto.

Sempre que o lisado não atravessou completamente a coluna, após a centrifugação inicial, centrifugou-se novamente a uma velocidade mais elevada até a coluna ficar vazia. A coluna vazia foi colocada num novo tubo coletor de 2ml e descartado o tubo contendo o filtrado. Seguidamente, adicionou-se 500µl de tampão AW1 à coluna, sem molhar o bordo da mesma, e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Após esta centrifugação colocou-se a coluna num novo tubo coletor de 2ml e descartou-se o tubo com o filtrado. Para as amostras de sangue total repetiu-se este processo da lavagem da coluna com o tampão AW1, três vezes seguidas, descartando-se o filtrado entre cada lavagem. Para amostras de plasma, soro e lesão efetuou-se apenas uma lavagem.

Após a lavagem com o tampão AW1, procedeu-se à segunda lavagem com o tampão AW2. Adicionou-se, sem molhar o bordo da coluna, 500µl do tampão AW2 à mesma e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Depois desta centrifugação, colocou-se a coluna num novo tubo coletor de 2ml e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Para as amostras de sangue total foi também necessário repetir este processo da lavagem, três vezes seguidas, descartando o filtrado sempre antes da seguinte lavagem.

Concluídas as lavagens, colocou-se a coluna num novo tubo coletor de 2ml e centrifugou-se a 13000 rpm por 1 minuto para remoção de qualquer resíduo de tampão que pudesse estar presente. A coluna, após descartado o tubo contendo o filtrado, foi colocada num tubo de microcentrifuga de 1,5ml limpo, tendo-se adicionado à mesma 75µl de tampão de eluição AE e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após esse período efetuou-se centrifugação a 13000 rpm por 1 minuto, o eluído foi recolhido no tubo de microcentrifuga de 1,5ml e descartou-se a coluna. O DNA extraído foi armazenado a 4°C.

O mesmo protocolo foi utilizado para a extração de DNA, a partir de 200µl de extrato testicular (5×10^3 *T. pallidum*/µl) de coelho infetado com *T. pallidum* estirpe de Nichols. Este DNA foi utilizado como controlo positivo e a sua preparação nunca decorreu em paralelo com a das amostras.

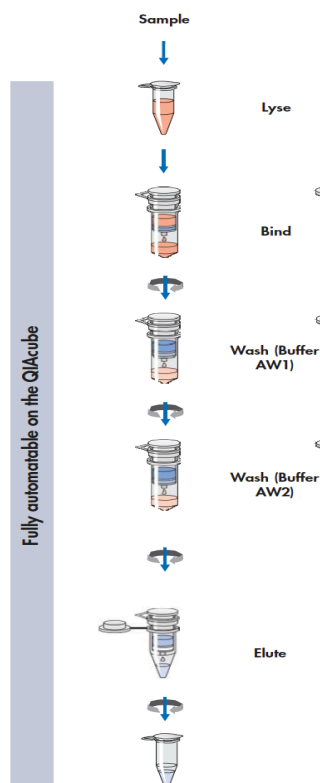


Figura. 19 – Esquema de extração usando colunas QIAamp.

II.II b. Pesquisa de DNA de *Treponema pallidum* por técnica de PCR-Multiplex

Para pesquisar a presença de DNA de *Treponema pallidum* nas amostras incluídas no estudo efetuou-se uma técnica de amplificação do DNA baseada em Orle *et al.* (1996) e em Lui *et al.* (2001) utilizando sequências de “primers” que têm como alvos de amplificação duas regiões específicas: uma do gene da lipoproteína da membrana de 47kDa, e outra do gene da enzima DNA polimerase I (*PolA*), de *T. pallidum* (Tabela 7).

Tabela 7. “Primers” utilizados na técnica de PCR-Multiplex.

“Primers”	Sequência Oligonucleótidos	Gene Alvo	Tamanho do fragmento amplificado
<i>VP PolA</i> Forward	5'-TGC GCGTGTGCGAATGGGTGGTC-3'	<i>PolA</i>	395 pb
<i>VP PolA</i> Reverse	5'-CACAGTGCTCAAAAACGCGTGACACG-3'		
<i>KO3</i>	5'-GAAGTTTGTCCAGTTGCGGTT-3'	<i>Lp 47kDa</i>	260 pb
<i>KO4</i>	5'-CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA-3'		

Esta técnica foi designada de PCR-Multiplex (PCR-M) por utilizar os dois conjuntos de “primers”, permitindo a amplificação das regiões alvo dos dois genes em simultâneo, tendo sido executada em todas as amostras incluídas no estudo.

Com o objetivo de otimizar a técnica procedeu-se a diversos ensaios preliminares alterando: as concentrações do cloreto de magnésio ($MgCl_2$) da mistura da reação e as temperaturas de ligação dos “primers” às sequências alvo nas condições de amplificação, usando como referência o controlo positivo. Após estes ensaios concretizados, foram selecionadas as melhores condições para a elaboração da mistura de reação e das condições de amplificação.

Na Tabela 8 estão discriminados os reagentes e respetivas concentrações utilizadas por amostra na constituição da mistura de reação para a técnica de PCR-M, para um volume final de reação de 25µl (20µl de mistura de reação e 5µl de amostra a estudar ou de controlos) colocados em tubos eppendorfs de 0,2ml. A enzima DNA polimerase utilizada foi a Immolase (Bioline), e os “primers” foram sintetizados pela casa comercial “Invitrogen”.

Todas as amostras foram submetidas a amplificação no termociclador “Tpersonal da Biometra” com as condições detalhadas na Tabela 9. Inicialmente as amostras foram sujeitas a um ciclo de 95°C por 7 minutos, para desnaturação inicial, à qual se seguiram 45 ciclos de amplificação compostos por desnaturação a 95°C durante 30 segundos, temperatura de “annealing” a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. Concluídos os ciclos, seguiu-se uma fase final de extensão a 72°C durante 15 minutos. Finalizando o programa as amostras eram mantidas a 4°C no termociclador e depois guardadas a essa temperatura para uso posterior.

Em cada série de amostras estudadas pela técnica de PCR Multiplex foram analisados em simultâneo um controlo positivo (5µl de DNA extraído de *T. pallidum*) e um conjunto de controlos negativos (5µl de água destilada estéril), utilizando a mesma mistura de reação elaborada para a amplificação das amostras.

Tabela 8. Composição da mistura de reação para a técnica de PCR-M.

Reagentes	Concentração Final	Volume por tubo (µl)
H ₂ O	-----	13.45
Tampão	1X	2.5
dNTP	8 µM	1.5
MgCl ₂	3 mM	1.5
<i>KO3A</i> Forward	0,2 µM	0.3
<i>KO4</i> Reverse	0,2 µM	0.3
<i>VP PolA</i> Forward	0,2 µM	0.3
<i>VP PolA</i> Reverse	0,2 µM	0.3
Immolase ¹	0.5 U	0.1
DNA	-----	5
Volume Total	-----	25

¹Bioline

Tabela 9. Condições de amplificação para a técnica PCR-M.

Etapa	Temperatura (graus Celsius)	Tempo (minutos/segundos)	Número de Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	7 m	1
Desnaturação	95°C	30 s	45
“Annealing”	60°C	30 s	
Extensão	72°C	30 s	
Extensão final	72°C	15 m	1
Manutenção	4°C	∞	

II.II b.1. Visualização do produto amplificado

Para verificar a presença ou ausência de produto amplificado utilizou-se uma técnica de electroforese em gel de agarose. Para tal elaborou-se um gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE a 0,5%, ao qual foi adicionado brometo de etídeo (0,5µg/ml). Em papel

de parafilme adicionou-se a 2µl de tampão de amostra (solução saturada de sacarose com azul de bromofenol), 10µl dos produtos de PCR aplicando-se em seguida nos poços do gel. Este foi submetido a um campo elétrico entre 100V a 120V em tampão TAE 0,5%, por um período de 1 hora a 1 hora e 20 minutos, no aparelho de eletroforese “Biometra”. Em todos os géis estudados foi colocado como auxiliar no processo de determinar a massa molecular dos produtos obtidos o marcador de peso molecular “Hyperladder II” da Bioline, que determina o tamanho de ácidos nucleicos entre 50 a 2000 pares de bases. Para validar os resultados obtidos e visualizados nos géis todos incluíram um controlo positivo e controlos negativos.

Após eletroforese, os géis foram observados por exposição aos raios ultravioletas no aparelho Gel Doc, utilizando o programa informático “Quantity One 1-D Analysis Software” (versão 4.6.1) da Bio-Rad que permitiu captar e fotografar as imagens dos produtos de amplificação. A visualização de uma banda de 260pb correspondente à amplificação do fragmento do gene de *Lp 47kDa* e/ou de uma de 395pb resultante da amplificação de um fragmento do gene de *PolA* foram considerados como resultado positivo, para a pesquisa de DNA de *T. pallidum* e a sua ausência como negativo para essa pesquisa (Figura. 20).

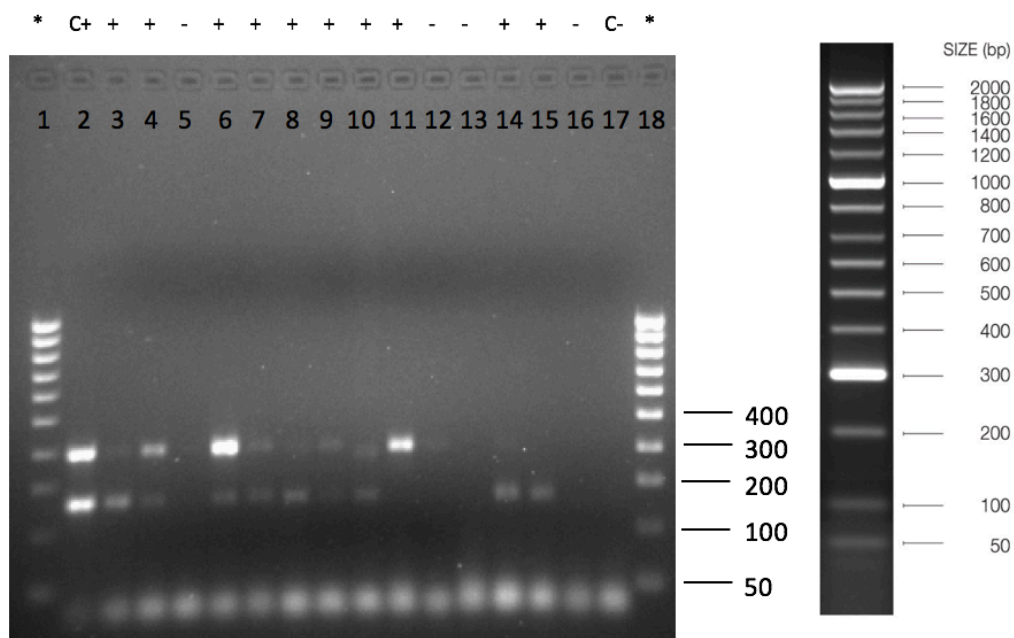


Figura. 20 – Fotografia de um gel de agarose de 1,5% exposto a luz UV para visualização dos produtos amplificados pela técnica de PCR-M. Poço 1 e 18 Marcador Hyperladder II; Poço 2 Controlo Positivo; Poço 17 Controlo Negativo; Poços 3, 4, 6 a 11, 14 e 15 amostras amplificadas; Poços 5, 12, 13 e 16 amostras não amplificadas.

II.II c. Pesquisa de DNA de *Treponema pallidum* por técnica de PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em Tempo Real (PCR-TR) é uma técnica de biologia molecular que permite monitorizar a amplificação da região alvo em tempo real, em vez de só no final, como ocorre com um teste de PCR convencional. Ambas apresentam o mesmo fundamento, distinguindo-se pelo facto da técnica de PCR-TR utilizar uma sonda de tipo TaqMan específica da zona a amplificar, marcada com um fluorómetro. Esta permite monitorizar a amplificação do DNA alvo, uma vez que o nível de fluorescência aumenta proporcionalmente à amplificação. Os valores da fluorescência emitida são detetados e analisados pelo aparelho, Rotor Gene 3000, do PCR-TR, sendo elaborado um gráfico.

A técnica de PCR-TR, efetuada neste estudo usou um par de “primers” (TrepU/TrepA) que têm como alvo de amplificação o gene da enzima DNA polimerase I e respetiva sonda TaqMan (Trep-TM), os quais foram desenhados e fornecidos pela TIB MOLBIOL (Quilaban) e estão descritos na Tabela 10. Todas as amostras incluídas neste trabalho foram estudadas através desta técnica.

Tabela 10. “Primers” e sonda utilizados na amplificação de um fragmento do gene da enzima DNA Polimerase I de *T. pallidum* pela técnica de PCR-TR.

“Primers” / Sonda	Oligonucléotidos	Gene alvo
Trep U	5’ – GCACAGAACAGCATGGGGTAT – 3’	DNA Polimerase I (<i>PolA</i>)
Trep A	5’ – ATTATGCATAACAAGTGTGAGCGT – 3’	
Trep TM	6FAM – CAAAGACGTCGAAGCTGGTGCATGAC – TMR	

A utilização dos controlos, positivo e negativo, validam os resultados obtidos. A partir dos controlos negativos obteve-se o limite (*threshold*) de um resultado negativo e, do controlo positivo, uma curva de amplificação. O Threshold estabelece uma linha base a partir da qual se determina quais as amostras amplificadas e não amplificadas.

Inicialmente elaborou-se a mistura de reação (Tabela 11), para um volume final de 18µl (13,6µl de mistura de reação e 3,4µl de DNA de amostra) num microtubo de 0,2ml. Esta mistura consistiu em 4,68µl de água destilada estéril adicionada, 0,1µM de cada um dos “primers” (Trep U e Trep A), 0,2µM da sonda (Trep TM) e 9µl de uma mistura de

reação comercializada SensiFast (Bioline). Por cada série de amostras a estudar inclui-se um conjunto de controlos, um positivo (igual ao utilizado na técnica de PCR-M) e um negativo (DNA substituído por água destilada estéril), empregando-se a mesma mistura de reação.

Tabela 11. Composição da mistura de reação utilizada na técnica de PCR em Tempo Real.

Reagentes	Concentração Final	Volume por tubo (µl)
H ₂ O	-----	4.68
TrepU	0.1 µM	0.18
TrepA	0.1 µM	0.18
Trep TM	0.2 µM	0.36
SensiFast	1X	9
DNA	-----	3.6
Volume Final	-----	18

A reação de amplificação foi efetuada no termociclador Rotor-Gene 3000 da Quilaban, utilizando-se o software Rotor-Gene versão 6.1.93, com as condições discriminadas na Tabela 12. Inicialmente as amostras foram sujeitas a um único ciclo de 95°C por 10 minutos para a ativação enzimática e desnaturação, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, seguidos de 60°C por 1 minuto. Concluído o programa, a visualização da reação de amplificação foi observada em tempo real no computador acoplado ao termociclador Rotor-Gene 3000 e os resultados foram registados num gráfico, correspondendo ao sinal emitido pela sonda.

Tabela 12. Condições de amplificação da técnica de PCR-TR.

Etapa	Temperatura (graus Celsius)	Tempo (minutos/segundos)	Número de Ciclos
Ativação da enzima Desnaturação	95°C	10 m	1
Desnaturação	95°C	10 s	40
“Annealing”	60°C	1 m	

Cada amostra clínica foi considerada como positiva para a pesquisa de ADN de *Treponema pallidum* sempre que se observou a presença de uma curva de amplificação superior ao limite (*threshold*), sendo considerada negativa na sua ausência.

A Figura 21 ilustra um gráfico obtido pela técnica de PCR-TR resultante da amplificação de amostras de exsudados de lesões, com o Threshold determinado através dos controlos negativos, e a curva do controlo positivo bem visível.

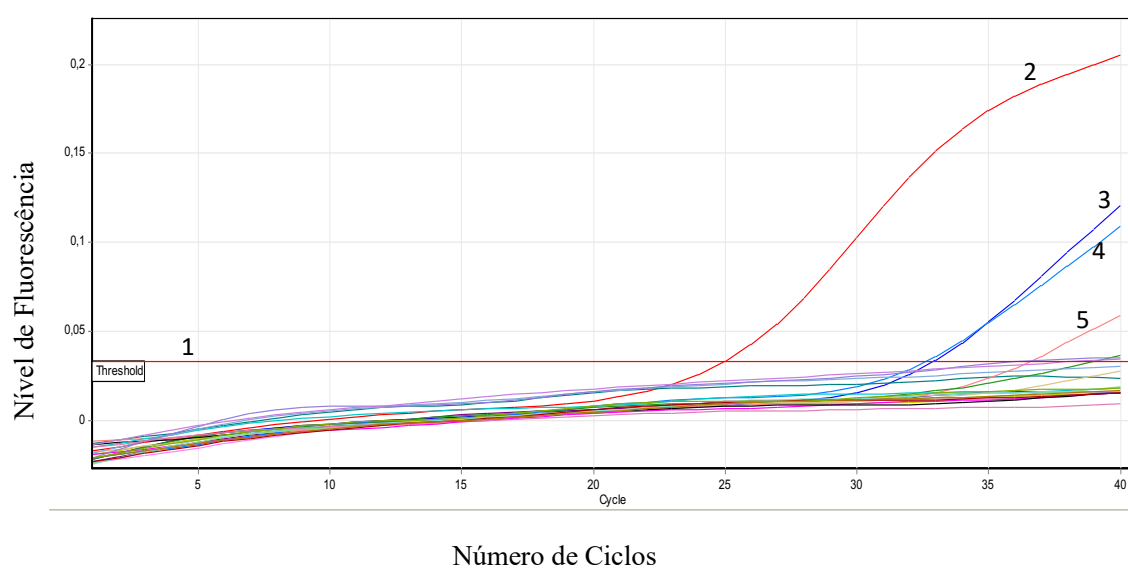


Figura. 21 – Gráfico obtido pela técnica de PCR-TR resultante do estudo de amostras de lesões. 1 Threshold (Controlo Negativo); Curva 2 Controlo Positivo; Curvas 3,4,5 – amostras amplificadas; Curvas inferiores ao Threshold – amostras não amplificadas.

III. Resultados

III.I Pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum*

Tal como anteriormente mencionado, 663 amostras de sangue foram estudadas através de técnicas serológicas para rastreio de sífilis. Os testes utilizados foram o RPR, TPHA, Anti-Sífilis e o Determine. Este último não foi executado em 33 amostras. Na Tabela 13 estão descritos os resultados dos testes, RPR, TPHA e Determine.

Tabela 13. Resultados dos testes RPR, TPHA e Determine.

	RPR		TPHA		Determine	
	Reativo	Não Reativo	Reativo	Não Reativo	Reativo	Não Reativo
Amostras	339	291	512	118	529	101
%	53,8%	46,2%	81,3%	18,7%	84%	16%
Total	630 (100%)		630 (100%)		630 (100%)	

O teste Determine foi reativo em 84% (529/630) amostras e não reativo em 16% (101/630). A reatividade obtida com o teste RPR foi de 53,8% (339/630), enquanto que no teste TPHA foi de 81,3% (512/630). O teste RPR não apresentou reatividade em 46,2% (291/630), sendo o teste TPHA não reativo em 18,7% (118/630).

As Tabelas 14 a 17 ilustram, respetivamente, os resultados obtidos na comparação dos vários testes estudados.

Os testes RPR e TPHA foram simultaneamente reativos em 53,5% (337/630) e não reativos em 18,4% (116/630). Duas amostras foram reativas apenas no teste RPR (0,3%), enquanto que em 175 (27,8%) amostras, o teste TPHA foi o único reativo (Tabela 14).

Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos com os testes RPR vs. TPHA.

		TPHA		
		Não Reativo	Reativo	Total
RPR	Não Reativo	116 18,4%	175 27,8%	291 46,2%
	Reativo	2 0,3%	337 53,5%	339 53,8%
	Total	118 18,7%	512 81,3%	630 100%

Os testes Determine e RPR foram simultaneamente reativos em 53,2% (335/630) e não reativos em 15,4% (97/630). Quando comparados um com o outro, quatro amostras (0,6%) apresentaram reatividade somente no teste RPR, enquanto que 30,8% (194/630) o foram apenas com o teste Determine (Tabela 15).

Tabela 15. Comparação dos resultados obtidos com o Determine vs. RPR.

		RPR		
		Não Reativo	Reativo	Total
Determine	Não Reativo	97 15,4%	4 0,6%	101 16%
	Reativo	194 30,8%	335 53,2%	529 84%
	Total	291 46,2%	339 53,8%	630 100%

Na comparação dos testes Determine e TPHA estes foram simultaneamente reativos em 81% (510/630) e não reativos em 15,7% (99/630). O primeiro destes testes demonstrou ser o único com reatividade em 3% (19/630) das amostras. Por outro lado, o teste TPHA foi exclusivamente reativo em 0,3% (2/630) das amostras (Tabela 16).

Tabela 16. Comparação dos resultados obtidos com os testes Determine vs. TPHA.

		TPHA		
		Não Reativo	Reativo	Total
Determine	Não Reativo	99	2	101
		15,7%	0,3%	16%
	Reativo	19	510	529
		3%	81%	84%
	Total	118	512	630
		18,7%	81,3%	100%

Nas amostras com resultados discrepantes entre o teste Determine e o TPHA (21/630), utilizou-se outro teste rápido treponêmico denominado Anti-Sífilis. Na Tabela 17 estão descritos os resultados obtidos.

Tabela 17. Resultados dos testes TPHA, Determine e Anti-Sífilis.

Testes	Anti-Sífilis		Total
	Reativo	Não Reativo	
TPHA + Determine -	2 100%	0 0%	2 100%
TPHA – Determine +	10 52,6%	9 47,4%	19 100%

O teste Anti-Sífilis foi reativo nas duas amostras que apresentaram reatividade apenas no teste TPHA e em dez amostras das dezanove reativas somente com o teste Determine. A não reatividade do teste Anti-Sífilis foi detetada em nove amostras, nas quais apenas o teste Determine foi reativo.

III.II Pesquisa de DNA de *Treponema pallidum*

III.II a. Técnica de PCR-Multiplex

A presença de DNA de *T. pallidum* foi detetada em 8,3% (18/217) das amostras de sangue que demonstraram reatividade superior ou igual a 1:4 no teste RPR, sendo que em 91,7% (199/217) não se obteve amplificação de DNA (Tabela 18).

Tabela 18. Resultados obtidos nas amostras de sangue pela técnica de PCR-M.

Identificação de DNA de <i>Treponema pallidum</i>		
Amostras	Negativo	Positivo
	199	18
	91,7%	8,3%
Total: 217 (100%)		

Na Tabela 19 encontram-se discriminados os resultados da técnica de PCR-M de acordo com os genes pesquisados.

Tabela 19. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M de acordo com os genes *PolA* e *Lp 47kDa*.

Pesquisa dos genes <i>PolA</i> e <i>Lp 47kDa</i>			
Amostras	<i>PolA</i> & <i>Lp 47kDa</i> ¹	<i>Lp 47kDa</i> ²	<i>PolA</i> ³
	1	13	4
%	0,5%	6%	1,8%
Total: 217 (100%)			

¹ *Lp 47kDa* – Gene da lipoproteína de membrana *47kDa*.

² Número de amostras amplificadas apenas para o gene *Lp 47kDa*.

³ Número de amostras amplificadas apenas para o gene *PolA*.

Um fragmento do gene *Lp 47kDa* foi amplificado em 6% (13/217) das amostras, do gene *PolA* em 1,8% (4/217) e os dois em simultâneo em 0,5% (1/217). O número total de amostras em que existiu amplificação de qualquer um dos fragmentos dos genes estudados foi de 7,8% (17/217).

Na globalidade e analisado os resultados obtidos com a técnica de PCR, o DNA de *T. pallidum* foi detetado em seis das 50 (12%) amostras de lesões (Tabela 20). Numa destas amostras, amplificou-se o DNA de *T. pallidum* em simultâneo para os dois genes estudados. Nas restantes cinco amostras apenas o fragmento do gene *Lp 47kDa* foi detetado (Tabela 21).

Tabela 20. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M nas amostras de lesões.

Identificação de DNA de <i>T. pallidum</i>		
	Não	Sim
Amostras	44	6
	88%	12%
Total: 50 (100%)		

Tabela 21. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M de acordo com os genes *PolA* e *Lp 47kDa*.

Pesquisa dos genes <i>PolA</i> e <i>Lp 47kDa</i>			
	<i>PolA</i> & <i>Lp 47kDa</i> ¹	<i>Lp 47kDa</i> ²	<i>PolA</i> ³
Amostras	1	5	0
%	2%	10%	0%
Total: 50 (100%)			

¹ *Lp 47kDa* – Gene da lipoproteína de membrana 47kDa.

² Número de amostras amplificadas apenas para o gene *Lp 47kDa*.

³ Número de amostras amplificadas apenas para o gene *PolA*.

III.II b. Técnica de PCR em Tempo Real.

Tal como se referiu anteriormente, as 267 amostras (217 de sangue e 50 de lesões) foram também estudadas pela técnica de PCR em Tempo Real.

Em 2,8% (6/217) das amostras de sangue detetou-se a presença de DNA de *Treponema pallidum*, enquanto que em 97,2% (211/217) não se registou a sua presença (Tabela 22).

Tabela 22. Resultados obtidos pela técnica de PCR-TR nas amostras de sangue.

Amplificação de DNA		
Amostras %	Sim	Não
	6 2,8%	211 97,2%
Total: 217 (100%)		

Nas amostras de lesões, o DNA de *T. pallidum* foi identificado em 26% (13/50). Não foi possível detetar a sua presença em 74% (37/50) (Tabela 23).

Tabela 23. Resultados obtidos pela técnica de PCR em Tempo Real nas amostras de lesões.

Amplificação de DNA		
Amostras %	Sim	Não
	13 26%	37 74%
Total: 50 (100%)		

Das 50 amostras de lesões estudadas, 25 tinham também amostras de sangue, pertencentes aos mesmos utentes, as quais foram analisadas pelas técnicas de serologia anteriormente referidas, com exceção do teste Anti-Sífilis já mencionado. De seguida, comparou-se os resultados dos testes serológicos versus a técnica de PCR-TR (Tabela 24).

Tabela 24. Resultados dos testes serológicos obtidos a partir de amostras de sangue correspondentes a amostras de lesões estudadas pela técnica de PCR-TR.

		RPR		TPHA		Determine		Total
		Reativo	Não Reativo	Reativo	Não Reativo	Reativo	Não Reativo	PCR-TR
PCR-TR	Positivo	8	0	7	1	7	1	8
	Negativo	17	0	17	0	16	1	17
Total		25	0	24	1	23	2	25

Em oito das 25 amostras de lesões a técnica de PCR-TR identificou a presença de DNA de *T. pallidum*.

A técnica de RPR foi reativa nas 25 amostras de sangue acima mencionadas, enquanto que a de TPHA apresentou reatividade em 24 e o teste Determine em 23. Relacionando as amostras de lesões em que a presença de DNA de *Treponema pallidum* foi detetada pela técnica de PCR (8/25 – 32%) com os resultados obtidos nas amostras de sangue pelas técnicas serológicas verificou-se serem reativas pela técnica de RPR oito (8/8) e pelos testes TPHA e Determine sete (7/8) enquanto que num caso estes testes foram não reativos.

III.II c. Comparação entre as técnicas de PCR – Multiplex e Tempo Real

As Tabelas 25 e 26 comparam, respetivamente, os resultados obtidos entre as técnicas de PCR Multiplex e Tempo Real nas amostras de sangue e de lesões.

O DNA de *T. pallidum* foi detetado em 20 amostras de sangue por qualquer uma das técnicas de PCR efetuadas, sendo que não foi identificado em 90,8% (197/217) das mesmas. Em 1,8% (4/217), a deteção ocorreu em simultâneo pelas duas técnicas. De entre as 2,8% (6/217) amostras com DNA de *T. pallidum* identificado pela técnica de PCR-TR, apenas 1,8% (4/217) das mesmas amostras foram corroboradas pela técnica de PCR-M, tal não aconteceu com 0,9% (2/217) das amostras. Em 6,5% (14/217) das amostras o DNA de *T. pallidum* foi somente identificado pela técnica de PCR-M (Tabela 25).

Tabela 25. Comparação das técnicas de PCR Multiplex e Tempo Real – amostras de sangue.

		PCR-TR		
		Negativo	Positivo	Total
PCR-M	Negativo	197 90,8%	2 0,9%	199 91,7%
	Positivo	14 6,5%	4 1,8%	18 8,3%
	Total	211 97,2%	6 2,8%	217 100%

Considerando-se as duas técnicas de PCR utilizadas a amplificação de DNA de *T. pallidum* foi detetada em 13 amostras de lesões, enquanto que tal não aconteceu em 74% (37/50) dessas amostras. Em 12% (6/50) a detecção foi possível para as duas técnicas em simultâneo. A técnica de PCR-M não detetou DNA deste microrganismo em nenhuma amostra em que *T. pallidum* não tivesse sido detetado pela segunda técnica estudada, sendo que esta detetou DNA em mais sete amostras (Tabela 26).

Tabela 26. Comparação das técnicas de PCR-M e PCR-TR na amplificação das amostras de lesões.

		PCR-TR		
		Negativo	Positivo	Total
PCR-M	Negativo	37 74%	7 14%	44 88%
	Positivo	0 0%	6 12%	6 12%
	Total	37 74%	13 26%	50 100%

IV. Discussão & Conclusões Finais

Nos últimos anos a incidência, a nível mundial, das infeções sexualmente transmissíveis (IST) tem aumentado substancialmente, incluindo nos países de alta renda, nos quais existe disponibilidade de terapêuticas adequadas e medidas de prevenção para a maioria destas infeções (ECDC. 2015). Na generalidade dos casos, este aumento súbito das IST's nas últimas décadas tem sido atribuído às mudanças comportamentais a nível sexual (ECDC. 2015), desde relações sexuais desprotegidas a múltiplos parceiros sexuais (Solomon e Mayer. 2015), especialmente na população HSH (Lopes *et al.* 2016, ECDC. 2015), com particular incidência nas doenças como a sífilis, gonorreia e o HIV (ECDC. 2015, ECDC. 2014).

Em relação à sífilis, o assunto desta tese, e apesar de existir uma terapêutica adequada há cerca de 78 anos (Parascandola. 2007), esta continua a ser prevalente (Valentine e Bolan. 2018, Lithgow e Cameron. 2017), tornando-se necessárias medidas preventivas para reduzir o índice de morbilidade (Juher *et al.* 2017, Pinto *et al.* 2014). Alguns autores investigaram a possibilidade da criação de uma vacina (Lithgow e Cameron. 2017, Champredon *et al.* 2016, Ambrose. 2016). No estudo efetuado por Lithgow e Cameron (2017), estes sumarizaram os motivos pelos quais é necessário desenvolver uma vacina e reforçaram todas as mais valias que teria nos esforços de erradicação da infeção, revendo os estudos prévios efetuados sobre o tema. Champredon *et al.* (2016) procederam a uma avaliação do impacto potencial da criação de uma vacina hipotética, através de um modelo matemático detalhado e Ambrose (2016) alertou para o contínuo aumento da resistência bacteriana aos antibióticos. Neste contexto, referiu a existência de algumas estirpes de *Treponema pallidum* em que se observou resistência ao antibiótico de segunda linha utilizado na terapêutica da infeção e advertiu quanto à possível aquisição de futuras resistências à penicilina, pelo que a existência de uma vacina será uma mais valia.

A deteção precoce e o acesso rápido ao tratamento em conjunto com a utilização do preservativo são atualmente as melhores formas de prevenção. A implementação de programas de monitorização (Barton *et al.* 2016, ECDC. 2012, Spiteri. 2015) e a utilização da comunicação social (noticiários e anúncios) para a divulgação da doença e de quais os métodos de prevenção poderiam ter auxiliado na redução do número de casos de sífilis. No entanto, apesar destas iniciativas tem-se observado nos últimos anos um aumento constante desta infeção, principalmente nos HSH (ECDC. 2012).

Estudos da correlação entre a incidência de novos casos de sífilis com a atividade sexual da população concluíram que a investigação de redes de contactos (D'Angelo-Scott *et al.* 2015) e a análise dos comentários das redes sociais (Twitter) (Young *et al.* 2017) podem servir para alertar as comunidades. Além disso, permite monitorizar a incidência de novos surtos e os locais mais suscetíveis à transmissão de infeções sexualmente transmissíveis (D'Angelo-Scott *et al.* 2015, Young *et al.* 2017). O estudo efetuado por Young *et al.* (2017) analisou mais de 8500 Tweets geolocalizados nos Estados Unidos e filtrou-os por palavras relacionadas com comportamentos de risco como “Sexo, Oral, Anal, etc.”. Depois separou-os por regiões definidas que, nos Estados Unidos, correspondem a condados. Os casos de sífilis notificados pelo CDC de 2012 a 2013 foram então associados aos Tweets acima mencionados. Os condados com um número superior de Tweets durante 2012 estavam correlacionados com um aumento de cerca de 2,7% de casos de sífilis primária e secundária, registados em 2013. Os resultados do estudo confirmaram assim a existência de uma associação entre os casos de sífilis e os Tweets selecionados.

D'Angelo-Scott *et al.* (2015) utilizaram as redes sociais dos contactos de indivíduos com sífilis para mapear grupos e regiões com casos desta doença e concluíram que a aquisição de uma IST está associada à rede sexual de um indivíduo e não se limita ao número de parceiros sexuais conhecidos. A construção desta rede social de contactos possibilitou a identificação de ligações previamente desconhecidas entre o número de casos de sífilis, os parceiros sexuais e a sua associação a locais (bares, balneários, spas, clubes, etc.) e páginas na internet para encontros sexuais. A continuação da existência de casos de sífilis, sendo esta uma doença que se pode eliminar facilmente, tendo em conta que é totalmente curável com antibióticos de baixo custo (Monojit e Subhrendu. 2016) e para o qual o agente infeccioso nunca adquiriu resistências (Stamm. 2015), é preocupante. Assim, a avaliação de testes laboratoriais rápidos e que permitam a sua utilização em condições adversas é de extrema importância (Diaz *et al.* 2004, Campos *et al.* 2006, Sato *et al.* 2003, Bergman *et al.* 2013, Benzaken *et al.* 2011).

Os métodos de diagnóstico de sífilis têm evoluído ao longo dos anos, existindo hoje em dia uma enorme variedade de técnicas, especialmente as de tipo POC. A investigação nesta área resultou do facto de existirem populações sem acesso a cuidados de saúde, nomeadamente a testes laboratoriais. No que diz respeito à sífilis, ao HIV e a outras ISTs e essencialmente durante a gravidez, onde a prevenção da transmissão ao

recém-nascido é essencial, a necessidade destes testes é premente. Esta situação teve como consequência o investimento no desenvolvimento de testes que exigem colheitas pouco invasivas e que obedecem ao critério “ASSURED”: disponibilidade para quem deles necessita, obtenção rápida de resultados, não dependência de qualquer equipamento, especificidade e sensibilidade elevadas, utilização fácil e de baixo custo, condições não totalmente preenchidas pelos testes até então disponíveis (Castro e Pereira. 2017, Ansbro *et al.* 2015). A elaboração dos testes POC tem possibilitado um maior progresso no controlo e prevenção de algumas ISTs, ao permitir um diagnóstico precoce e atingir um maior número de populações, incluindo populações isoladas, sem meios financeiros e/ou educacionais e grupos populacionais de risco (Toskin *et al.* 2017).

A comercialização dos testes POC tem vindo a crescer, havendo uma procura exponencial, uma vez que vários locais a nível mundial implementaram o uso destas técnicas como parte da sua rotina laboratorial no diagnóstico de infeções para as quais estão disponíveis (HIV, hepatite, sífilis, etc.) (Osredkar. 2017). Para além da sua utilidade e capacidade como método de diagnóstico em regiões empobrecidas e isoladas, podem também ser utilizados no rastreio em unidades móveis, mesmo em populações citadinas, de modo a ser mais facilmente aceite pelas populações, profissionais de saúde e por consequência chegar a um número maior de pessoas. Os profissionais de saúde podem assim deslocar-se a regiões mais isoladas com os testes, permitindo o acesso a populações de risco como, por exemplo, utilizadores de drogas endovenosas, trabalhadores do sexo, assim como grávidas, entre outros, que por diversos motivos não procuram clínicas e hospitais (Lipstiz *et al.* 2014, Castro e Pereira. 2017). Vários estudos confirmaram a importância da contribuição dos testes POC no diagnóstico, tratamento e prevenção de infeções sexualmente transmissíveis. Por isso, tornou-se necessário prosseguir com o investimento no desenvolvimento deste tipo de técnicas de diagnóstico de modo a abranger outros microrganismos, melhorar a sua sensibilidade e especificidade e a torná-los menos dispendiosos (Osredkar. 2017, Bergman *et al.* 2013, Toskin *et al.* 2017).

Nesta tese analisaram-se os testes RPR, TPHA e Determine com o objetivo de identificar a presença de anticorpos anti-*Treponema pallidum* em amostras de sangue, comparar entre si os resultados obtidos e avaliar o seu desempenho no diagnóstico desta infeção.

Também se procurou compreender o valor de duas técnicas de PCR (Multiplex e Tempo Real) no diagnóstico de sífilis, comparando-as entre si e quando possível com os

testes serológicos clássicos, utilizados habitualmente no diagnóstico. A população alvo neste estudo restringiu-se a Homens que têm Sexo com Homens – HSH, na região de Lisboa, uma vez que ao longo dos últimos anos se tem descrito que neste grupo populacional os novos casos de sífilis têm vindo a aumentar (Workowski e Berman. 2006, Barton *et al.* 2016, Wohrl e Geusau. 2007, CDC. 2014).

IV.I Serologia – Pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum*

No presente estudo foram analisadas 630 amostras de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* pelos três testes serológicos anteriormente referidos. Após a sua leitura e de acordo com o que se esperava, os testes treponémicos demonstraram uma maior percentagem de resultados reativos (84% e 81,3%) respetivamente, para o Determine e TPHA do que a técnica de RPR (53,8%).

Este teste pesquisa anticorpos anti-cardiolipina que são inespecíficos sendo produzidos como resposta à infeção por *T. pallidum*, a outros treponemas, assim como a doenças de origem não treponémica (Cox e Ballard. 2010) como a mononucleose infecciosa, leptospirose (Larsen *et al.* 1998, Castro. 2004), malária, lepra, doença de chagas (Morshed e Singh. 2015) e infeções causadas por vírus, micoplasmas ou protozoários (Borkhardt e Zielinski. 1997). Por isso, torna-se necessária a confirmação da sua reatividade por um teste treponémico (Castro. 2004, Saral *et al.* 2012). De um modo geral, a percentagem de falsos positivos pode ser pequena numa população com elevada prevalência de sífilis (Nah *et al.* 2017, Castro *et al.* 2014), pelo que não se esperaria que influenciasse demasiado estes resultados e não servindo de justificação à discrepância observada, em que o teste RPR apresenta uma reatividade mais baixa do que os testes específicos. Para os resultados deste estudo e na comparação entre o RPR e os testes específicos, poderiam ter contribuído não só o fenómeno de “prozona” (Larsen *et al.* 1998, Nandwani e Evans. 1995, Saral *et al.* 2012, Morshed e Singh. 2015), como as características diferentes inerentes aos testes treponémicos e não treponémicos. Quanto ao fenómeno de “prozona”, tal não poderia ter acontecido, porque todas as amostras foram diluídas (Dyck *et al.* 1999, Morshed e Singh. 2015, Geisler. 2004) e como tal este problema foi ultrapassado. Assim, a segunda hipótese parece ser a que justifica estes resultados: os testes treponémicos permanecem reativos pelo resto da vida do doente (Holmes *et al.* 2008) após a infeção inicial, independentemente do tratamento e da cura (Morshed e Singh. 2015, Campos *et al.* 2006). Por isso, não podem ser

utilizados para avaliar a resposta à terapêutica administrada (Castro. 2004). Pelo contrário, uma característica dos testes não treponêmicos é a diminuição da sua reatividade quando efetuada a terapêutica correta (Castro *et al.* 2003), permitindo a monitorização do tratamento (Geisler. 2004). Assim e de acordo com os resultados obtidos, muito provavelmente a diferença encontrada entre os dois tipos de testes significa a existência, nesta população, de cerca de 30% de indivíduos com infeção por *T. pallidum* tratada com sucesso.

Na comparação dos testes RPR e TPHA observou-se, no total, uma concordância de resultados em 71,9% das amostras. No entanto, 0,3% foram reativas pelo teste RPR, não sendo confirmadas pelo TPHA. Estes casos podem provavelmente atribuir-se a reações de falsa reatividade, resultante da menor especificidade do teste RPR. Num estudo efetuado em 120 indivíduos com suspeita de sífilis, que recorreram a uma clínica de IST's na Índia, os autores Monojit e Subhrendu (2016) verificaram que duas (1,6%) amostras eram reativas no teste RPR e não reativas no TPHA, tendo estes resultados sido considerados como falsos positivos. O mesmo aconteceu num estudo efetuado na Eslovénia numa população com elevada prevalência de sífilis, por Simcic e Potocnik (2015), os quais verificaram o mesmo tipo de resultados em 4/437 (0,9%) das amostras. Os títulos de RPR nessas amostras foram inferiores a 1:8, tendo-se verificado que pertenciam a indivíduos com antecedentes de infeção por hepatite B em dois casos e em um por herpes, não havendo informação clínica sobre o quarto indivíduo.

No presente estudo, 27,8% (175) das amostras foram reativas pelo teste TPHA e não reativas pelo RPR. No estudo de Monojit e Subhrendu (2016) acima referido, aqueles autores demonstraram que o teste TPHA detetou alguns casos de sífilis latente tardia, nos quais o teste não treponémico tinha sido não reativo. No entanto, reconheceram que a maioria dessas amostras poderiam corresponder a indivíduos com sífilis tratada, o que muito provavelmente poderá ser a explicação para os resultados do estudo atual.

Apenas 53,5% das amostras do presente estudo foram simultaneamente reativas pelos dois testes, uma percentagem menor do que a encontrada por Monojit e Subhrendu (2016), Murawala *et al.* (2015) e Dumre *et al.* (2011), que descreveram percentagens de 75,92%, 91,08% e 80,4%, respetivamente. As razões possíveis para a diferença entre estes resultados e os obtidos no atual trabalho poderão ser explicadas pela região geográfica em que foram efetuados os estudos acima mencionados e pelo tipo de população estudada. Aquelas populações podem ter menos comportamentos de risco e, portanto, um menor

número de infecções passadas. A possibilidade de menor acesso aos cuidados de saúde resultando numa menor administração de terapêutica pode ser outra hipótese. O estudo de Monojit e Subhrendu (2016) foi elaborado na Índia, cuja população incluía grupos populacionais com diferentes graus de comportamento de risco, desde indivíduos com HIV, trabalhadores do sexo, imigrantes e grávidas. No trabalho efetuado na Índia por Murawala *et al.* (2015) analisaram-se 148 amostras de soro de utentes de clínicas de IST's, com elevada suspeita clínica de sífilis também provenientes de grupos populacionais semelhantes aos do estudo de Monojit e Subhrendu (2016). Por último, no estudo de Dumre *et al.* (2011) efetuado no Nepal, as 504 amostras de soro analisadas eram também provenientes de indivíduos com suspeita de sífilis.

As investigações acima referidas foram elaboradas em países de baixa renda, nos quais o acesso a condições de saúde e a tratamento é muito limitado (Dumre *et al.* 2011), especialmente nos grupos populacionais alvo selecionados. Pelo contrário, no presente estudo, a população restringiu-se ao grupo de risco HSH, utentes de uma única clínica na área de Lisboa, os quais têm acesso facilitado a cuidados de saúde. As condições de saúde e o acesso ao tratamento poderão ser fatores determinantes passíveis de explicar a diferença entre este e os trabalhos mencionados, uma vez que provavelmente a população de HSH estudada tem acesso facilitado ao diagnóstico e tratamento. A pesquisa de Dumre *et al.* (2011) parece confirmar esta afirmação, uma vez que menciona a ausência de cuidados de saúde básicos disponíveis no Nepal e de recursos para diagnosticar e tratar a população. Estes resultados justificar-se-iam, também e como anteriormente mencionado, pelo facto da reatividade do teste RPR diminuir até negativar ao longo do tempo, como resultado de terapêutica anterior. Esta situação também serve como explicação da discrepância observada entre a percentagem total de reatividade do teste RPR (53,8%) e dos testes treponémicos obtidos neste estudo (cerca de 80-85%), uma vez que os cerca de 30% de casos exclusivamente reativos pelos testes treponémicos são muito provavelmente casos de sífilis passada, numa população que tem um índice de prevalência de infeção muito alto com elevada probabilidade de reinfeções.

Tanto quanto se tem conhecimento não existem artigos que façam uma comparação entre os testes Determine e RPR, incluindo a análise da sensibilidade e especificidade, utilizando quer amostras de soro ou plasma no diagnóstico de sífilis numa população HSH.

Na comparação do teste RPR com o Determine observou-se uma taxa de concordância de 68,6%. Quatro amostras (0,6%) apresentaram reatividade com o teste RPR, sendo não reativas com o Determine e como duas foram também não reativas pela técnica de TPHA, muito provavelmente serão reações de falsa reatividade (0,3%) pelo teste RPR.

Como esperado, verificou-se um maior número de amostras reativas com o teste Determine relativamente ao RPR, tendo este sido reativo em mais 194 (30,8%) amostras, constatando-se uma discrepância de 31,4%. Tal como anteriormente referido é plausível inferir que estas 194 amostras correspondam a casos de sífilis passada. Relativamente a estas 194 amostras, confirmou-se que 175 também foram reativas pelo teste TPHA, o que permite reafirmar a hipótese acima colocada: a de serem maioritariamente casos de sífilis tratada, uma vez que foram reativas apenas nos dois testes treponémicos. As restantes 19 amostras (3%), reativas apenas pelo teste Determine e, não havendo mais informação, os resultados obtidos poderão corresponder a falsa reatividade deste teste.

Um estudo efetuado em diversos hospitais, na Bolívia, por Tinajeros *et al.* (2006), numa população de mulheres grávidas, com uma prevalência de pelo menos 3% de infeção, avaliou a eficácia dos testes Determine e RPR no diagnóstico de sífilis. Estes autores utilizaram como referência os resultados obtidos pelo teste RPR confirmado pelo TPPA (considerado como “Gold Standard”) em amostras provenientes de uma população de mulheres grávidas, utentes dos hospitais. O teste Determine foi reativo em 442/8892 amostras, resultando numa percentagem de reatividade de 5% nesta população. Também verificaram que a sensibilidade e especificidade do teste Determine foi de 91,85% e 98,5%, respetivamente, quando comparado com o “Gold Standard” (RPR e TPPA) efetuado no laboratório de referência. Valores semelhantes e até mais elevados foram observados noutros estudos (Diaz *et al.* 2004, Sato *et al.* 2003), especialmente em relação à sensibilidade (Tinajeros *et al.* 2006) (Tabela 27).

Tabela 27. Resultados de estudos de avaliação do teste POC (Determine)

Origem	Número total de amostras	Tipo de Amostra	Gold Standard	Sensibilidade (95% CI)	Especificidade (95% CI)
Bolívia (Tinajeros <i>et al.</i>)	8889 mulheres grávidas	Sangue total Soro	RPR, reativos confirmados por TPPA	91,8%	98,5%
Brasil*∇ (Diaz <i>et al.</i>)	567 indivíduos de uma clínica de doenças infecciosas	Soro	TPHA	95,6% - 97,6%	96,3% - 97,3%
Brasil*∇ (Diaz <i>et al.</i>)	567 indivíduos de uma clínica de doenças infecciosas	Soro	VDRL & TPHA	96,9% - 97,9%	96,3% - 97,3%
Brasil (Sato <i>et al.</i>)	125 amostras (63 sífilis confirmada; 24 outras ISTs; 38 sífilis seronegativo)	Soro	Avaliação Clínica, VDRL, FTA-ABS, TPHA, ELISA	93,7%	95,2%
*Mesmo estudo, características da eficácia relacionadas com diferentes referências standard.					
∇ Características da eficácia dos testes obtidas por três leitores diferentes					

Adaptado de Tinajeros *et al.* (2006).

Tinajeros *et al.* (2006) verificaram também que o teste Determine apresentou uma maior reatividade do que o RPR efetuado nos hospitais (75,7%), quando comparado com o “Gold Standard” considerado, o que significa que cerca de 16% dos casos não seriam diagnosticados se apenas utilizado este teste. Os autores comentam que esta falta de sensibilidade do RPR efetuado nos hospitais, pode dever-se à menor experiência do pessoal de laboratório ou a um controlo de qualidade inadequado. O bom desempenho do teste Determine provavelmente está relacionado com o facto de ser mais fácil de executar do que o RPR. Mesmo que o teste Determine possa apresentar alguns resultados de falsa reatividade, estes não têm a mesma importância que um resultado de falsa não reatividade, tendo em conta que é sempre melhor tratar em excesso do que não tratar, especialmente em mulheres grávidas que possam ter contraído a infeção: mulheres grávidas residindo num país de baixa renda não frequentam as consultas pré-natais com a regularidade necessária, sendo que cerca de 50% não regressam às clínicas para obter os resultados dos seus testes laboratoriais, nomeadamente o do RPR (Tinajeros *et al.* 2006), pelo que nunca recebem terapêutica. Esta situação fica ultrapassada com a execução de testes rápidos com elevada sensibilidade e especificidade, como é o caso do teste Determine.

Diaz *et al.* (2004) confirmou a sensibilidade e especificidade do teste Determine, entre 95,6%-98,4% e 95,7-97,3% respectivamente, usando o teste TPHA como “Gold Standard”. Por outro lado, Lien *et al.* (2000), no estudo em amostras de soro, plasma e sangue obtidas de uma população de utentes de hospitais e clínicas, verificou uma concordância de 99,3% entre os testes Determine e TPPA.

Conclusões diferentes foram obtidas por Campos *et al.* (2006) num estudo efetuado no Peru com 3682 trabalhadoras do sexo de uma zona rural, nas quais a prevalência anteriormente registada era de 6%. Nesta população, apenas 3586 (97,4%) consentiram em efetuarem este teste rápido através de “fingerstick” e somente 3483 (97,1%) consentiram também na colheita de sangue venoso. As amostras foram estudadas “on site” pelo teste Determine e num laboratório por este teste e pelos testes RPR e TPHA. Cerca de 5,7% (198/3483) das amostras foram reativas pelo teste RPR efetuado no laboratório, tendo 90% (178/198) sido confirmadas pelo teste TPHA, mas apenas 2,8% (98/3586) das amostras foram reativas pelo teste Determine “on site”. Os autores testaram novamente as 178 amostras reativas por RPR e TPHA com o teste Determine no laboratório, mas utilizando soro, tendo obtido reatividade em 97% (172/178) das amostras. A conclusão foi de que o teste Determine demonstrou menor sensibilidade “on site” do que quando utilizado no laboratório. Também outros estudos, como os de Diaz *et al.* (2004) e Lien *et al.* (2000) encontraram alta sensibilidade (95%-98%) e especificidade (95%-97%) do teste Determine, quando efetuado no laboratório. Estes autores propuseram que a utilização de amostras de soro com este teste poderia resultar numa sensibilidade superior à obtida quando utilizadas amostras de sangue total, o que foi também descrito em estudos anteriores referidos pelo fabricante. Como tal, o tipo de amostra analisada parece ter um impacto no desempenho do teste, embora no presente estudo e noutro como anteriormente referido (Tinajeros *et al.* 2006), em que foram utilizadas amostras de sangue total, a sensibilidade deste teste foi elevada.

O teste Determine parece ter uma sensibilidade elevada, para além da especificidade esperada para um teste treponémico, quando efetuado corretamente, tanto em laboratórios como “on site”. Tendo em conta as publicações acima mencionadas e o presente estudo, sempre que apresenta resultados sub-ótimos como os referidos anteriormente, estes são geralmente justificados por deficiências, quer ao nível do material utilizado, quer dos profissionais que executam o teste.

Apesar dos testes TPHA e Determine serem testes treponémicos, os seus constituintes diferem entre si, o que poderá explicar a diferença entre as percentagens de reatividade encontradas neste trabalho. O teste TPHA é um teste de hemaglutinação que utiliza *Treponema pallidum* estirpe Nichols como antigénio (Larsen *et al.* 1998, Naidu *et al.* 2012), enquanto que o Determine é um teste rápido imunocromatográfico, cujo antigénio é constituído pela proteína TpN47 de *Treponema pallidum* (Zhuang *et al.* 2012). Esta (TpN47) lipoproteína membrana imunogénica é vital na ativação das células endoteliais e na patogenicidade da bactéria (Zhuang *et al.* 2012, Chamberlain *et al.* 1989, Riley *et al.* 1992). Vários investigadores referem que os anticorpos anti-TpN47 estão presentes em todos os estádios da infeção sífilítica não tratada (Zhuang *et al.* 2012, Lemos *et al.* 2007). Diversos autores referem que no início da infeção a técnica de TPHA pode ser não reativa, sendo que o FTA-ABS pode ser mais precocemente reativo (Larsen *et al.* 1998, Jaffe *et al.* 1978, Dyckman *et al.* 1980). Esta limitação do teste TPHA é mencionada por Larsen *et al.* (1998), sendo também confirmada por outros autores (Morshed e Singh. 2015, Jaffe *et al.* 1978, Dyckman *et al.* 1980). Eventualmente, esta situação, o tipo de proteína pesquisada e a possibilidade de existência de erros imputáveis à execução dos testes poderia, em parte, justificar o maior número de amostras reativas pelo teste Determine.

No presente estudo, verificou-se uma taxa de concordância de 96,7% entre os resultados dos dois testes (Determine e TPHA) com uma discrepância de 3,3%. O teste Determine (84%) demonstrou uma maior reatividade que o TPHA (81,3%). Por outro lado, todas as amostras reativas pelo TPHA (81,3%) foram também reativas pelo teste Determine, com exceção de duas, enquanto que este último foi reativo em mais 19 amostras que o TPHA. Estas 19 amostras não apresentaram reatividade pelo teste RPR. Tendo em conta estes dados é possível supor que possam ser resultantes ou de casos de sífilis tratada ou de falsos positivos pelo teste Determine. No entanto, trabalhos (Bocoum *et al.* 2015, Sena *et al.* 2010, Jafari *et al.* 2013, Diaz *et al.* 2004) previamente elaborados concluíram que este teste apresentava uma alta sensibilidade e especificidade, pelo que a possibilidade de serem casos de sífilis tratada poderá ser a hipótese a considerar na maioria dos resultados obtidos no presente trabalho. Na comparação entre os dois testes treponémicos, duas amostras foram apenas reativas no TPHA, tendo-o sido também quando testadas pelo RPR (titulações de 1:8 e de 1:16). Estas duas amostras podem representar resultados de falsa negatividade do teste Determine (0,3%).

O estudo de Bocoum *et al.* (2015) avaliou a eficácia de 4 testes rápidos em relação à sensibilidade e especificidade de cada um, incluindo o Determine em amostras de soro

de uma população de dadores de sangue no Burkina Faso. Este estudo utilizou o TPHA como “Gold Standard” e os autores concluíram que o teste Determine demonstrou ser o mais eficaz entre os testes rápidos POC avaliados, estando o seu desempenho de acordo com os limites estipulados pela Organização Mundial de Saúde que recomenda uma sensibilidade e especificidade mínimas de 85% e de 95%, respetivamente.

Morshed e Singh (2015) efetuaram uma revisão sobre os avanços mais recentes no diagnóstico serológico de sífilis, na qual incluíram uma meta-análise sobre a eficácia de 18 testes POC no diagnóstico desta infeção em amostras de soro. Nesta revisão, o teste Determine foi, de entre todos, o que demonstrou a sensibilidade mais elevada, cerca de 92%. Outros estudos, como os de Lien *et al.* (2000) e Herring *et al.* (2006) confirmaram também a elevada sensibilidade deste teste quando comparada com testes laboratoriais “standard” e com testes POC.

No diagnóstico serológico de sífilis estão aconselhados dois métodos distintos para o rastreio da infeção, conhecidos como o algoritmo tradicional e o algoritmo de sequência-reversa (Morshed e Singh. 2015). O primeiro requer que o estudo serológico seja efetuado primeiro por um teste não treponémico que, no caso de reatividade, se confirma com um teste treponémico (Morshed e Singh. 2015, Workowski e Bolan. 2015). Pelo contrário, a “International Union against Sexually Transmitted Infections” (IUSTI) (French *et al.* 2009) recomenda a utilização do algoritmo de sequência-reversa, sendo o estudo serológico iniciado com um teste treponémico. No caso de reatividade deve então efetuar-se um teste não treponémico, o qual se for não reativo obriga à execução de um segundo teste treponémico (French *et al.* 2009, Morshed e Singh. 2015). Neste estudo, utilizou-se primeiro o teste Determine, o qual se comparou com um não treponémico e treponémico, respetivamente o RPR e o TPHA. Nos resultados não concordantes entre os testes TPHA e Determine (21 amostras) efetuou-se o teste treponémico Anti-Sífilis, cuja sensibilidade e especificidade é, de acordo com o fabricante, de 99,7% e 99,6%, respetivamente (Laboquick, 2008).

Das 19 amostras que apenas apresentaram reatividade no teste Determine, 10 foram reativas pelo teste Anti-Sífilis e as restantes nove não reativas. É plausível assumir que as 10 amostras reativas por dois testes treponémicos possam ser resultados de não reatividade do teste TPHA na presença de infeção curada, uma vez que também foram não reativas pelo teste RPR. Com as restantes nove amostras poderá ter sucedido o

inverso, mas no que diz respeito ao teste Determine. Das amostras estudadas e reativas pelo teste TPHA, duas foram não reativas pelo Determine, as quais apresentam também reatividade no RPR e no teste Anti-Sífilis. Da análise destes resultados é possível inferir que estas amostras possam ser casos de não reatividade pelo Determine em presença de infecção por *T. pallidum*, uma vez que apresentaram todos os outros testes com reatividade, incluindo o RPR com titulações de 1:8 e 1:16.

IV.II Pesquisa de DNA de *Treponema pallidum*

Nas últimas décadas tem havido um aumento de estudos sobre o valor diagnóstico das técnicas de PCR no diagnóstico de sífilis (Burstain *et al.* 1991, Centurion-Lara *et al.* 1997, Liu *et al.* 2001, Grange *et al.* 2012, Costa *et al.* 2018). Devido à dificuldade e à complexidade do diagnóstico associado aos métodos habituais como os testes serológicos, detecção direta e sintomatologia clínica (Costa *et al.* 2018, Grange *et al.* 2012, Kriesel *et al.* 2016) existe a necessidade de investir num método que possa eventualmente ser mais fiável para o diagnóstico, pelo que se pensou na técnica de PCR (Grange *et al.* 2012, Costa *et al.* 2018, Smajs *et al.* 2006) como uma possível alternativa à metodologia diagnóstica atual. A técnica de PCR foi pela primeira vez utilizada em amostras clínicas de doentes com sífilis por Hay *et al.* em 1990 (Sato. 2011, Hay *et al.* 1990), sendo que diversos investigadores (Shields *et al.* 2012, Gayet-Ageron *et al.* 2013, Liu *et al.* 2001) têm desde essa altura avaliado esta mesma técnica. Alguns destes estudos têm como base o gene *PolA* para a identificação da presença de DNA de *T. pallidum* (Liu *et al.* 2001, Gayet-Ageron *et al.* 2015, Wang *et al.* 2014, Castro *et al.* 2007), enquanto que outros investigadores utilizaram o gene *Lp 47kDa* (Palmer *et al.* 2003, Buffet *et al.* 2007, Shields *et al.* 2012, Castro *et al.* 2007). De entre estes, Shields *et al.* (2012) analisaram casos de sífilis primária e secundária em amostras de lesões e obtiveram uma sensibilidade e especificidade nas lesões primárias de 89,1% e de 99,1% e de 50% e 100% nas secundárias, respetivamente. Estes referiram que noutros estudos (Palmer *et al.* 2003, Buffet *et al.* 2007) percentagens semelhantes ou mais elevadas de sensibilidade e especificidade tinham sido observadas com o mesmo tipo de amostras. Os autores também mencionaram que de acordo com a sensibilidade obtida em lesões de sífilis secundária, esta técnica poderá não ser uma mais valia, uma vez que a sensibilidade dos testes RPR em simultâneo com os testes treponémicos é de aproximadamente 100% (Larsen *et al.* 1995). Palmer *et al.* (2003) pesquisaram o gene *Lp 47kDa* e detetaram DNA

de *T. pallidum* em amostras de lesões. Estes obtiveram uma sensibilidade e especificidade, respectivamente de 94,7% e de 98,6% em casos de sífilis primária e percentagens menores em casos de sífilis secundária (80% e de 98,6%, respectivamente).

Neste estudo, as técnicas de PCR utilizadas foram PCR Multiplex e PCR em Tempo Real. A pesquisa de DNA de *T. pallidum* foi efetuada em 267 amostras (217 de sangue e 50 de lesões) das 663 totais.

A técnica de PCR-Multiplex (PCR-M) foi utilizada para pesquisar em simultâneo dois genes (*PolA* e *Lp 47kDa*) de *T. pallidum*, os quais têm sido frequentemente estudados e com bons resultados, embora separadamente, uma vez que deste modo se tornaria uma metodologia menos dispendiosa, demorada, trabalhosa e possivelmente com uma maior sensibilidade do que quando se realizam as duas técnicas em separado. Estudos com a técnica de PCR-M são em pequeno número, como por exemplo os de Castro *et al.* (2007, 2016), sendo que estes autores apenas analisaram amostras de sangue de casos de sífilis latente e de LCR de indivíduos com suspeita de neurosífilis.

Neste estudo, a técnica de PCR-Multiplex identificou a presença de DNA de *T. pallidum* em 8,3% das amostras de sangue analisadas, que tal como anteriormente referidas apresentaram um teste RPR com uma titulação igual ou superior a 1:4. O DNA de *Treponema pallidum* foi identificado por esta técnica em 12% da totalidade das amostras de lesões estudadas, confirmando que este método parece ser mais eficaz no diagnóstico de sífilis em amostras de lesões do que de sangue. No presente estudo foi também possível observar que um fragmento do gene *Lp 47kDa* foi amplificado em 6% das amostras de sangue e o do gene *PolA* foi apenas amplificado em 1,8%. Do mesmo modo, nas amostras de lesões, um fragmento do gene *Lp 47kDa* foi amplificado em 10%, enquanto que este nunca ocorreu apenas com o fragmento do gene *PolA*.

O estudo de Liu *et al.* (2001) avaliou a técnica de PCR tendo como alvo o gene *PolA* para identificar a presença de DNA de *Treponema pallidum* em 112 amostras de lesões e verificaram uma sensibilidade e especificidade de 95,8% e 95,7%, respectivamente. Os autores compararam os resultados obtidos com uma técnica de PCR-M, assim chamada por pesquisar em simultâneo três organismos diferentes (*T. pallidum*, *Haemophilus ducreyi* e *herpes simplex*), na qual se utilizou o gene *Lp 47kDa* para a pesquisa de *T. pallidum*. Liu *et al.* (2001) identificaram a presença de DNA de *T. pallidum* por estas duas técnicas (PCR *PolA* & PCR-M) em 19,6% das lesões e verificaram uma

taxa de concordância de 95,5% e de discordância em 4,5%. Quatro amostras foram apenas identificadas pela técnica de PCR *PolA*, não o tendo sido pela técnica de PCR-M e o inverso foi observado numa única amostra que foi identificada pela técnica de PCR-M. Os investigadores afirmaram que os resultados dos dois métodos (PCR *PolA* e PCR-M utilizando o gene *Lp 47kDa*) eram comparáveis, que esta técnica demonstrou ser útil na deteção de *T. pallidum* em lesões e que eventualmente poderá também ser utilizada em outros tipos de amostras como sangue total, soro, plasma, lesões e líquido cefalorraquidiano (LCR).

Como referido anteriormente, o estudo de Shields *et al.* (2012) realizou uma técnica de Tp-PCR para pesquisa de um fragmento do gene *Lp 47kDa*, no qual foram analisadas amostras de lesões de indivíduos com sífilis primária e secundária. Os autores conseguiram identificar DNA de *T. pallidum* em 89,1% das amostras de lesões primárias e em 50% das lesões secundárias. Estes afirmaram que a técnica de Tp-PCR utilizando este fragmento de gene é sensível e específica para casos de sífilis primária, sendo um método que poderá facilitar um diagnóstico e tratamento mais eficaz e rápido nesta situação. Os investigadores também comentaram que o desempenho desta técnica de PCR demonstrou ser comparável aos de publicações prévias (Palmer *et al.* 2003, Buffet *et al.* 2007) que utilizaram este tipo de técnica com o mesmo gene. O estudo de Burstain *et al.* (1991) também avaliou a técnica de PCR para a pesquisa do gene *Lp 47kDa* em diversos tipos de amostras (soro, LCR e líquido amniótico) pertencentes tanto a doentes com infeção por *T. pallidum* como a indivíduos sem infeção. Os investigadores verificaram a presença de DNA de *T. pallidum* em 62,5% (5/8) das amostras analisadas. A especificidade deste gene foi estudada efetuando a sua pesquisa em outras subespécies de treponemas (*T. pallidum denticola*, *T. pallidum pertenue*) e bactérias (*B. hermsii*, *L. interrogans*) e concluíram que a técnica foi específica, uma vez que não observaram amplificação nas amostras controlo (indivíduos sem infeção) e que demonstrou ser capaz de distinguir o gene alvo de *T. pallidum* dos genes dos restantes microrganismos.

Diferentemente dos autores anteriores, Gayet-Ageron *et al.* (2015 a) pesquisou o gene *PolA* e o gene *Lp 47kDa* e comparou-os, uma vez que não está especificado qual o gene mais eficaz para a pesquisa de *T. pallidum*. Os investigadores observaram uma concordância em 98,53% (268/272) nas amostras de lesões analisadas, havendo divergências em quatro amostras de utentes com resultados serológicos reativos. Destas, apenas duas foram identificadas pela técnica de PCR *PolA*, não o sendo por PCR *Lp 47kDa* e o inverso foi observado em outras duas. Estes resultados levaram a concluir que

as amostras eram verdadeiramente positivas, uma vez que os doentes receberam tratamento, após o qual foram considerados curados. Também referiram que esta técnica parece ser eficaz no diagnóstico da infeção por *T. pallidum* e que os resultados não dependem do gene alvo estudado, sugerindo que tanto o gene *PolA* como o *Lp 47kDa* poderiam ser utilizados. Segundo os autores, um estudo anteriormente referido (Liu *et al.* 2001), num número menor de amostras, registou também uma concordância elevada entre estes dois genes. Castro *et al.* (2007) observaram sensibilidades semelhantes entre a técnica de Tp-PCR com estes dois genes e a combinação das duas (PCR-M) em amostras de sangue, mas não avaliaram a concordância entre as técnicas.

A diferença observada no número de amostras de sangue (8,3%) e de lesões (12%), identificadas com presença de DNA de *T. pallidum*, poderá dever-se ao facto de a presença de lesões resultar da propagação da bactéria nessa região, o que poderá levar à existência de um número maior de microrganismos nesse local. Por este motivo, parece ser mais fácil detetar *Treponema pallidum* nestas amostras através de técnicas de PCR, embora no presente estudo a percentagem de deteção seja inferior ao referido noutras publicações. A baixa sensibilidade das técnicas de PCR no sangue pode dever-se à quantidade insuficiente de DNA de *T. pallidum*, porque a concentração deste microrganismo é extremamente baixa neste tipo de amostra (Burstain *et al.* 1991, Lukehart *et al.* 1988). Esta situação é problemática, uma vez que a sífilis é uma doença sistémica, na qual *T. pallidum* existe muitas vezes no sangue sem lesões e por isso na maioria dos casos o seu diagnóstico tem de ser efetuado em amostras deste tipo. Para além da possibilidade de baixa concentração treponémica no sangue, quando se consideram ambos os tipos de amostra (sangue e lesões) existem outros fatores que poderão também ter influenciado os resultados do presente estudo, como o tempo e condições de transporte e armazenamento com consequente degradação das amostras e contaminação e/ou erro humano na execução da técnica. Também é plausível supor que algumas das lesões enviadas não fossem resultantes de uma infeção por *T. pallidum*, mas sim de outra etiologia. Nos artigos acima mencionados é possível observar que a técnica de Tp-PCR parece ser um método eficaz no diagnóstico de sífilis em amostras de lesões.

Tal como anteriormente referido, Gayet-Ageron *et al.* (2015 a) concluíram que o gene alvo utilizado não tem um impacto nos resultados obtidos e que no seu estudo a concordância entre os genes foi muito elevada, o que foi também obtido por Liu *et al.* (2001). No presente trabalho observou-se o oposto, havendo uma clara diferença entre o

número de amostras identificadas por cada gene, sendo que o gene *Lp 47kDa* foi identificado mais frequentemente do que o *PolA* em amostras de sangue e de lesões. Contudo, obtiveram-se amostras de sangue que foram somente identificadas pelo gene *PolA* (1,8%), pelo que se apenas um dos genes tivesse sido pesquisado, alguns casos de sífilis não teriam sido detetados. A técnica de PCR-M permitiu assim a identificação em simultâneo destes dois genes, possibilitou identificar mais amostras e realizar um trabalho diferente dos estudos anteriores, que apenas pesquisaram estes genes separadamente.

A técnica de PCR em Tempo Real tem sido também utilizada para avaliar o seu potencial como método de diagnóstico, cujo princípio é semelhante ao das outras técnicas de PCR, exceto na utilização de uma sonda tipo Taqman fluorescente. Uma das suas vantagens reside na capacidade que apresenta de detetar os microrganismos diretamente, num período curto de tempo e de ser de fácil execução (Heymans *et al.* 2010). Esta técnica tem sido muito utilizada por alguns autores para pesquisarem o gene *PolA* (Koek *et al.* 2006, Leslie *et al.* 2007, Cruz *et al.* 2010, Gama *et al.* 2017), avaliando-o como um método de diagnóstico alternativo.

No presente estudo, a técnica de PCR-TR foi utilizada para avaliar a sua eficácia no diagnóstico de sífilis em comparação com a técnica de PCR-M acima referida, constitui uma boa alternativa, porque possui a vantagem de utilizar software para extrapolar os dados da amplificação, não estando sujeita a possíveis erros de interpretação humana. Para além desta vantagem necessita de menos quantidades de material de laboratório, é mais rápida, mais fácil de executar e menos propensa a contaminação.

Neste estudo, a técnica de PCR-TR identificou a presença de DNA em 2,8% (6/217) das amostras de sangue, enquanto que nas amostras de lesões foi identificada em 26% (13/50), seguindo o padrão obtido pela técnica de PCR-M quando se compara as amostras de sangue com lesões. No entanto, quando se analisa os resultados obtidos por cada uma das duas técnicas (PCR-M e PCR-TR) nas amostras de sangue, esta última detetou um menor número de amostras com DNA de *T. pallidum* do que a técnica de PCR-M (8,3%). Tal como anteriormente mencionado, existem diversos fatores que poderão ter influenciado os resultados obtidos para ambas as amostras estudadas (sangue e lesões), os quais também se aplicam à técnica de PCR-TR.

O estudo de Koek *et al.* (2006) avaliou esta técnica utilizando o gene *PolA* na detecção de DNA de *Treponema pallidum* em amostras de lesões, concluindo que é extremamente sensível e específica e poderá ser usada para detetar DNA de *T. pallidum* em amostras de lesões primárias. Os autores utilizaram dois termocicladores diferentes para realizar a técnica de PCR em Tempo Real (Rotor-Gene e iCycler) e analisar 112 amostras de lesões de doentes com suspeita de sífilis. Este estudo foi efetuado em dois laboratórios distintos, tendo sido ainda realizada uma técnica de PCR adicional (Nested PCR) como referência. As amostras foram consideradas positivas quando identificada a presença de DNA de *T. pallidum* pelas três técnicas de PCR, tendo o mesmo procedimento sido utilizado para os resultados negativos. As amostras discrepantes foram analisadas por microscopia de fundo escuro e pelos testes TPHA e FTA-ABS, para se estabelecer o melhor possível a presença ou não de infeção por *T. pallidum*. Cerca de 83,9% das amostras estudadas foram negativas e 12,5% foram positivas. A sensibilidade e a especificidade foram de 100% e 99% e de 93,8% e 100%, respetivamente, para a técnica de PCR-TR no Rotor-Gene e no iCycler, sendo que valores idênticos a estes foram obtidos na técnica de Nested PCR. Tendo em conta os resultados obtidos, concluíram que a pesquisa de DNA é um método bastante adequado para uso quotidiano em laboratórios e clínicas.

Heymans *et al.* (2010) também avaliaram a técnica de PCR-TR através da pesquisa do gene *PolA* em amostras de lesões genitais primárias e secundárias utilizando o Rotor-Gene. Os autores analisaram 716 amostras de lesões primárias e 133 de sífilis secundária de doentes de uma clínica na Holanda e verificaram que em 13% das lesões primárias foi identificado DNA de *T. pallidum*, enquanto este estava presente em 25,6% das lesões secundárias. Uma comparação entre os resultados obtidos pela técnica de PCR-TR nas amostras de lesões primárias e o diagnóstico clínico e serológico foi efetuado. A taxa de concordância foi de 94% entre a técnica de PCR-TR e o diagnóstico clínico e serológico nas lesões primárias e de 66,2% para sífilis secundária. Os autores verificaram nas amostras de lesões primárias uma sensibilidade e especificidade de 75% e de 97% e 43% e 98% para a sífilis secundária, respetivamente. Heymans *et al.* (2010) confirmaram que, apesar de terem obtido uma especificidade elevada na análise de sífilis secundária pela técnica de PCR-TR, a sensibilidade obtida foi extremamente baixa, não demonstrando assim ser uma mais valia no diagnóstico clínico neste estágio. De acordo com os resultados obtidos e acima apresentados afirmaram que apenas no diagnóstico de sífilis primária a técnica de PCR-TR é um método rápido e fiável.

No trabalho de Leslie *et al.* (2007) foi avaliada a eficácia da técnica de PCR-TR pela pesquisa pelo gene *PolA* no diagnóstico de sífilis em amostras de biópsias, lesões e LCR. Da análise de 301 amostras provenientes de doentes com suspeita de sífilis de diversas clínicas na região de Melbourne, em 13,6% foi identificado DNA de *T. pallidum*, existindo uma taxa de concordância com os testes serológicos de 95%. Os investigadores mencionaram que um dos principais problemas dos estudos da avaliação diagnóstica de técnicas de PCR reside na falta de um teste “Gold Standard”, sendo que este é fundamental para avaliar a eficácia e o valor das técnicas de PCR no diagnóstico desta infecção.

Nas publicações acima referidas é possível observar que as percentagens das amostras de lesões onde foi possível identificar DNA de *T. pallidum* pela técnica de PCR-TR não apresentaram grandes divergências das obtidas neste estudo. Os valores registados por ambos, Koek *et al.* (2006) (12,5%) e Leslie *et al.* (2007) (8,3%) demonstraram ser inferiores aos obtidos nas amostras de lesões (26%) deste trabalho, enquanto que Heymans *et al.* (2010) obtiveram uma percentagem ligeiramente superior (39%).

Publicações sobre a eficácia da técnica de PCR em Tempo Real com pesquisa do gene *PolA* em amostras de sangue são escassas e por esse motivo não foi possível efetuar uma comparação com os resultados obtidos neste estudo. Tal como anteriormente referido, as técnicas de PCR parecem demonstrar uma melhor sensibilidade quando efetuadas em amostras de lesões em vez de sangue, podendo ser por esse motivo que existem mais publicações sobre o seu estudo em lesões.

Tanto quanto é do nosso conhecimento não existem artigos publicados que efetuem a comparação da eficácia das técnicas de PCR-M e PCR-TR no diagnóstico de sífilis.

A análise da comparação destas duas técnicas de PCR (Tempo Real e Multiplex) demonstrou nas amostras de sangue e de lesões uma taxa de concordância de 92,6% e de 86% e uma taxa de discordância de 7,4% e de 14%, respetivamente. A técnica de PCR-M identificou a presença de DNA de *T. pallidum* em 14 amostras de sangue que não foram identificadas pela técnica de PCR-TR, enquanto que nas amostras de lesões esta técnica identificou a presença de DNA em todas as amostras com resultados positivos pela técnica de PCR-TR. Das 14 amostras de sangue, em 13 verificou-se unicamente a

amplificação do fragmento do gene *Lp 47kDa*. Provavelmente, esta situação resulta do facto de na técnica de PCR em Tempo Real se ter efetuado apenas a pesquisa do gene *PolA*. No entanto, esta técnica identificou DNA de *T. pallidum* em todas as amostras nas quais este tinha sido detetado pela técnica de PCR-M.

Por outro lado, a técnica de PCR-TR identificou DNA de *T. pallidum* em duas amostras de sangue e sete de lesões com resultados negativos pela técnica de PCR-M.

No trabalho realizado por Janeiro (2012) efetuado unicamente em amostras de soro, verificou-se que a técnica de PCR em Tempo Real detetou DNA de *T. pallidum* num número maior de amostras (41,8%) do que a técnica de PCR-M (28,3%), diferentemente do presente estudo, embora neste tenham sido utilizadas amostras de sangue. A taxa de concordância obtida no presente estudo para amostras de sangue foi superior (92,6%) à observada no trabalho de Janeiro (2012) em amostras de soro.

Uma vez que de 50 amostras de lesões estudadas, 25 tinham também amostras de sangue pertencentes aos mesmos utentes, decidiu-se analisá-las com o objetivo de verificar a concordância entre os resultados obtidos das amostras de lesões por técnica de PCR e os testes serológicos (RPR, TPHA e Determine).

Todas as 25 amostras apresentavam reatividade pelo teste RPR com titulações iguais ou superiores a 1:2 e os testes TPHA e Determine foram reativos em 24 e 23 destas amostras, respetivamente. A técnica de PCR-TR identificou DNA de *T. pallidum* em 32% (8) das amostras de lesões, o teste RPR apresentou reatividade nas oito e o TPHA e o Determine apenas em sete. Assim, todas as amostras nas quais a técnica de PCR detetou DNA de *T. pallidum* apresentaram reatividade no teste RPR, sendo que apenas uma foi não reativa com as técnicas de TPHA e Determine, respetivamente.

IV.III Conclusões Finais

O diagnóstico da sífilis continua hoje em dia a ser um processo complicado e complexo, devido à incapacidade de cultivar e propagar *T. pallidum* “in vitro” (Castro e Pereira. 2017), sem recorrer ao uso de modelos animais, mas que gradualmente tem melhorado com os avanços tanto de testes serológicos como das técnicas moleculares. O desenvolvimento de testes POC emergiu da necessidade de diagnosticar e tratar o mais depressa possível uma determinada infeção e consequentemente a sua transmissão, com o intuito de reduzir o aumento do número de indivíduos com infeções sexualmente transmissíveis. Testes baratos, rápidos e fiáveis, que por sua vez permitissem o acesso de populações isoladas ao diagnóstico e tratamento destas infeções têm sido desenvolvidos, existindo hoje em dia vários testes POC para algumas IST's, incluindo para a sífilis, embora a investigação neste campo seja ainda necessária. Ao mesmo tempo, existe uma procura contínua pela elaboração de testes mais eficazes, que possam vir a ser considerados como o “Gold Standard” no diagnóstico da sífilis, havendo inúmeros estudos efetuados sobre a eficácia de testes serológicos, POC e técnicas moleculares para o diagnóstico de *T. pallidum*.

De acordo com os resultados deste estudo, no que diz respeito à análise dos resultados serológicos é possível afirmar que a infeção por *T. pallidum* é prevalente na população estudada, com cerca de 30% de indivíduos apresentando infeção por *T. pallidum* curada.

Ainda nesta população, o número de amostras com resultados de falsa reatividade por parte do teste RPR foi reduzido. Estes resultados podem estar relacionados com o tipo de população em estudo, uma vez que quando existem comportamentos de risco existe uma maior probabilidade de se adquirir a infeção e consequentemente se detetarem um número maior de infeções passadas. Esta população tem também acesso facilitado ao diagnóstico e tratamento. A falsa reatividade dos testes tem tendência para ser menor, uma vez que a prevalência de IST's é geralmente maior em grupos de risco.

Em relação à análise do valor diagnóstico dos testes serológicos, o teste Determine demonstrou um melhor desempenho na deteção de anticorpos do que o TPHA, pelo que parece ser uma boa alternativa a este, principalmente pelas condições das populações ou pela sua área geográfica, quando existe vantagem na utilização de testes POC. A possibilidade do Determine ser um teste que sobre diagnostica não se tornaria tão importante nestas situações, em que é preferível tratar a mais do que a menos.

Em relação à análise dos resultados das técnicas de PCR foi possível observar uma taxa de concordância elevada entre as duas técnicas, tanto para as amostras de sangue como de lesões. Também foi possível verificar que a técnica de PCR-M, ao pesquisar simultaneamente dois genes, possibilitou a identificação de um maior número de amostras do que teria ocorrido efetuando a pesquisa somente com um gene, uma vez que neste estudo o gene *Lp 47kDa* foi identificado num número maior de amostras do que o gene *PolA*. Tendo em conta estes dados, seria de considerar efetuar-se a técnica de PCR em Tempo Real com pesquisa do fragmento do gene *Lp 47kDa*. Em relação às técnicas de PCR, este estudo confirmou a relação entre a eficácia das técnicas de PCR e o tipo de amostra analisada, uma vez que estas técnicas foram mais eficazes na detecção da presença de *T. pallidum* em amostras de lesões do que nas de sangue. Neste estudo, a técnica de PCR-TR pareceu ser mais eficaz do que a de PCR-M na identificação de DNA de *T. pallidum* nas amostras de lesões, embora o mesmo não tenha sido observado no que diz respeito às amostras de sangue.

Nas amostras de lesões em que foi possível efetuar testes serológicos e nos quais a técnica de PCR-TR detetou DNA de *T. pallidum*, o teste de RPR foi reativo. Mais estudos são necessários, num número maior de amostras para confirmar estes resultados e deduzir da especificidade desta técnica.

Em conclusão, as técnicas de biologia molecular, nomeadamente as técnicas de PCR, têm evoluído ao longo dos anos, mas de momento ainda não possuem a sensibilidade necessária para serem considerados como um novo “Gold Standard” no diagnóstico da sífilis. No entanto, os resultados obtidos neste estudo e em outros demonstram que as técnicas de PCR são uma opção viável, prática e útil como método de diagnóstico nas amostras de lesões. Contudo, torna-se necessário a continuação do investimento na investigação nestas técnicas com capacidade de identificar infeção por *T. pallidum* e eventualmente de outros métodos, essencialmente na ausência de sinais e sintomas clínicos, nomeadamente de lesões.

V. Referências Bibliográficas

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Introduction to The Cell; Manipulating Proteins, DNA and RNA*. In: Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of The Cell*. Capítulo 1, pg. 1-44; Capítulo 8, pg. 501-578. 5th edição. Garland Science, New York.

Alere. (2013). Alere Determine Syphilis Brochure – Global Manual. Alere International Limited. Galway, Ireland.

Ambrose, CT. (2016). Vaccines and the looming threat of Syphilis. *Global Vaccines Immunology*. Vol: 1, Issue: 1, pg. 8-13. Doi: 10.15761/GVI.1000104.

Ansbro, EM., Gill, MM., Reynolds, J., Shelley, KD., Strasser, S., Sripipatana, T., Ncube, AT., Mumba, GT., Prestholt, FT., Reeling, RW., Mabey, D. (2015). Introduction of Syphilis Point-of-Care Tests, from pilot Study to National Programme Implementation in Zambia: A Qualitative Study of Healthcare Worker's Perspectives on Testing, Training and Quality Assurance. *PLOS One*. Vol: 10, Issue: 6, pg. 1-18. Doi: 10.1371/journal.pone.0127728

Awal, N. (2014). Spirochetes. In: *Infectious Disease of Pathology (Bacterial Diseases)*.

Barton, J., Braxton, J., Voux, A., Flagg, E., Grier, L., Harvey, A., Kidd, S., Kirkcaldt, R., Krisel, K., Llata, E., Presley, R., Ramirez, V., Rivers, F., Rose, M., Smith, C., Stenger, M., Tilert, T., Torrone, E., Weinstock, H., Weston, E. (2016). Sexually Transmitted Disease Surveillance (STDs) 2015. *Division of STD Prevention, Centre for Disease Control*. pg. 1-176.

Beck, SV. (1997). "Syphilis: The Great Pox". In: Kiple, KF. *Plague, Pox & Pestilence: Disease in History*. London: Weidenfeld & Nicolson.

Benzaken, AS., Sabidó, M., Galban, E., Pedroza, V., Araújo, AJG., Peeling, RW, Mabey, D. (2011). Field performance of a rapid point-of-care diagnostic test for antenatal syphilis screening in the Amazon region, Brazil. *International Journal of STD & AIDS*. Vol: 22, Issue: 1, pg. 15-18. Doi: 10.1258/ijsa.2010.010145.

Bergman, J., Gratrix, J., Plitt, S., Fenton, J., Archibald, C., Wong, T., Singh, AE. (2013). Feasibility and Field Performance of a Simultaneous Syphilis and HIV Point-of-Care Test Based Screening Strategy in at Risk Populations in Edmonton, Canada. *AIDS Research and Treatment*. Vol: 2013, ID: 819593, pg. 1-8. Doi: 10.1155/2013/819593.

Bocoum, FY., Ouédraogo, H., Tarnagda, G., Kiba, A., Tiendrebeogo, S., Bationo, F., Liestman, B., Diagbouga, S., Zarowsky, C., Traoré, RO., Kouanda, S. (2015). Evaluation of the diagnostic performance and operational characteristics of four rapid immunochromatographic syphilis tests in Burkina Faso. *African Health Sciences*. Vol: 15, Issue: 2, pg. 360-367. Doi: 10.4314/ahs.v15i2.8

Borkhardt, HL., Zielinski, S. (1997). Influence of cardiolipin antibodies on the binding of treponemal specific antibodies in the fluorescence treponemal antibody absorption test and the *Treponema pallidum* immobilisation test. *Journal of Medical Microbiology*. Vol: 46, Issue: 11, pg. 965-972. Doi: 10.1099/00222615-46-11-965

Braxton, J., Davis, D., Flagg, E., Grey, J., Grier, L., Harvey, A., Kidd, S., Kreisel, K., Llata, E., Presley, R., Ramirez, V., Shapiro, S., Stenger, M., Torrone, E., Weinstock, H., Weston, E. (2017). Sexually Transmitted Disease Surveillance 2016. *Division of STD Prevention, Centres for Disease Control*. Pg. 1-164. Atlanta, Georgia.

Buchacz, K., Patel, P., Taylor, M., Kerndt, PR., Byers, RH., Holmberg, SD., Klausner, JD. (2004). Syphilis increases HIV viral load and decreases CD4 cell counts in HIV-infected patients with new syphilis infections. *AIDS (An Official International AIDS Society Journal)*. Volume 18, Issue 15, pg. 2075-2079. Doi: 10.1097/00002030-200410210-00012

Buffet, M., Grange, PA., Gerhardt, P., Carlotti, A., Calvez, V., Bianchi, A., Dupin, N. (2007). Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. *The Journal of Investigative Dermatology*. Vol: 127, Issue: 10, pg. 2345-2350. Doi: 10.1038/sj.jid.5700888

Burstain, JM., Grimprel, E., Lukehart, SA., Norgard, MV., Radolf, JD. (1991). Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 29, Issue: 1, pg. 62-69.

Campos, PE., Buffardi, AL., Chiappe, M., Buendía, C., Garcia, PJ., Carcamo, CP., Garnett, G., White, P., Holmes, KK. (2006). Utility of the Determine Syphilis TP rapid test in commercial sex venues in Peru. *Sexually Transmitted Infections*. Vol: 82, Supple V, pg. v22-v25. Doi: 10.1136/sti.2006.023325

Catterall, RD. (1972). Presidential address to the M.S.S.V.D: Systemic disease and the biological false-positive reaction. *British Journal of Venereal Diseases*. Vol: 48, Issue: 1, pg. 1-12. Doi: 10.1136/sti.48.1.1

Castro, R., Prieto, E., Santo, I., Azevedo, J., Exposto, F. (2001). Evaluation of the Passive Particle Agglutination Test in the Serodiagnosis and Follow-up of Syphilis. *American Journal of Clinical Pathology*. Vol: 116, Issue 4, pg. 581-585. Doi: 10.1309/9TCQ-B1TA-38MV-R6UM

Castro, R., Prieto, ES., Santo, I., Azevedo, J., Exposto, F. (2003). Evaluation of an Enzyme Immunoassay Technique for Detection of Antibodies against *Treponema pallidum*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 41, Issue 1, pg. 250-253. Doi: 10.1128/JCM.41.1.250-253.2003

Castro, R. (2004). Contribuição para o estudo de infecção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*: resposta serológica, diagnóstico molecular e genotipagem. Dissertação de Doutoramento pela Universidade Nova de Lisboa.

Castro, R., Prieto, E., Aguas, MJ., Manata, MJ., Botas, J., Santo, I., Azevedo, J., Pereira, FL. (2007). Detection of *Treponema pallidum sp pallidum* DNA in latent Syphilis. *International Journal of STD's & AIDS*. Vol: 18, Issue: 12, pg. 842-845. Doi: 10.1258/095646207782716901.

Castro, R., Lopes, A., Pereira, FL. (2014). Evaluation of an Immunochromatographic Point-of-Care Test for the Simultaneous Detection of Nontreponemal and Treponemal Antibodies in Patients with Syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*. Vol: 41, N°:8, pg. 467-469. Doi: 10.1097/OLQ.0000000000000161.

Castro, R., Águas, MJ., Batista, T., Araújo, C., Mansinho, K., Pereira, FL. (2016). Detection of *Treponema pallidum Sp. pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Vol: 30, Issue: 5, pg. 628-632. Doi: 10.1002/jcla.21913.

Castro, R., Pereira, FL. (2017). “The Role of Point-of-Care Testing in the Diagnosis of Syphilis”. In: Cheng, CM., Hsu, MY., Wu, MYC. (2017). Point-of-Care Diagnostics. Capítulo 6, pg. 141-154.

CDC – Centre for Disease Control and Prevention. (1991). Sexually transmitted Diseases Clinical Practices Guidelines. *US Department of Health and Human Services, Public Health Services*. Atlanta, GA. III-36-III-41

CDC – Centre for Disease Control and Prevention. (2010). Sexually Transmitted Diseases Guidelines, 2010. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol: 59, Nº: RR-12, pg. 1-16.

CDC – Centre for Disease Control and Prevention. (2012). Sexually Transmitted Disease Surveillance 2011. *US Department of Health and Human Services*. pg. 1-184. Atlanta, Georgia.

CDC – Centre for Disease Control and Prevention. (2014). *Reported STDs in the United States – 2012 National Data for Chlamydia, Gonorrhea and Syphilis*.

Centurion-Lara, A., Castro, C., Shaffer, JM., Voorhis, WCV., Marra, CM., Lukehart, SA. (1997). Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 35, Issue: 6, pg. 1348-1352.

Chamberlain, NR., Brandt, ME., Erwin, AL., Radolf, JD., Norgard, MV. (1989). Major integral membrane protein immunogens of *Treponema pallidum* are proteolipids. *American Society for Microbiology – Infection and Immunity*. Vol: 57, Issue: 9, pg. 2872-2877.

Champredon, D., Cameron, CE., Smieja, M., Dushoff, J. (2016). Epidemiological impact of a syphilis vaccine: a simulation study. *Epidemiology and Infection*. Cambridge University Press. Vol: 144, Issue: 15, pg. 3244-3252. Doi: 10.1017/S0950268816001643.

Chapel, TA. (1980). The signs and symptoms of secondary syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*. Vol: 7, Issue 4, pg. 161-164.

Chawla, V., Gupta, K., Raghu, MB. (1985). Congenital Syphilis: A Clinical Profile. *Journal of Tropical Pediatrics*. Vol: 31, Issue 4, pg. 204-208. Doi: 10.1093/tropej/31.4.204

Chiu, MJ., Radolf, JD. (1994). *Syphilis*. In: Hoeprinch, PD., Jordan, MC., Ronald, AR. Infectious diseases: A treatise of infectious processes. 5th edição, pg. 694-714. JB. Lippincott Company, Philadelphia.

Coles, AC. (1909). Spirocheate Pallida: Methods of examination and detection, especially by means of the dark ground illumination. *British Medical Journal*. Vol:1, Issue 2523, pg. 1117-1120. Doi: 10.1136/bmj.1.2523.1117

Costa, MS., Coutinho, D., Sobrinho, JS., Azevedo, F., Lisboa, C. (2018). Cross-sectional study of *Treponema pallidum* PCR in diagnosis of primary and secondary syphilis. *International Journal of Dermatology*. Vol: 57, Issue: 1, pg. 46-49. Doi: 10.1111/ijd.13823

Cox, D., Ballard, RC. (2010). “*Syphilis*”. In: Morse, SA., Holmes, KK., Ballard, RC. Atlas of Sexually Transmitted Diseases and AIDS. Capítulo 7, pg. 111-140. Doi: 10.1016/B978-0-7020-4060-3.00007-7

Cruz, AR., Pillay, A., Zuluaga, AV., Ramirez, LG., Duque, JE., Aristizabal, GE., Fiel-Gan, MD., Jaramillo, R., Trujillo, R., Valencia, C., Jagodzinski, L., Cox, DL., Radolf, JD., Salazar, JC. (2010). Secondary syphilis in cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol: 4, Issue: 5, pg. e690. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000690.

D’Angelo-Scott, H., Cutler, J., Friedman, D., Hendriks, A., Jolly, AM. (2015). Social network investigation of a syphilis outbreak in Ottawa, Ontario. *Canadian Journal Infectious Diseases and Medical Microbiology*. Vol: 26, Issue 5, pg. 268-272. Doi: 10.1155/2015/705720

Diaz, T., Almeida, MGB., Georg, I., Maia, SC., Souza, RV., Markowitz, LE. (2004). Evaluation of the Determine Rapid Syphilis TP Assay Using Sera. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol: 11, Issue: 1, pg. 98-101. Doi: 10.1128/CDLI.11.1.98-101.2004

Dumre, SP., Shakya, G., Acharya, D., Malla, S., Adhikari, N. (2011). Diagnostic dilemma of the single screening test used in the diagnosis of syphilis in Nepal. *Nepal Medical College Journal*. Vol: 13, Issue: 4, pg. 238-240.

Dyck, van E., Meheus, AZ., Piot, P. (1999). *Syphilis*. In: Dyck, van E., Meheus, AZ., Piot, P. Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases. Capítulo 3, pg. 36-49. World Health Organization, Geneva.

Dyckman, JD., Storms, S., Huber, T. (1980). Reactivity of Microhemagglutination, Fluorescent Treponemal Antibody Absorption and Venereal Disease Research Laboratory Tests In Primary Syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 12, Nº 4, pg. 629-630.

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). Sexually Transmitted Infections in Europe, 1990-2010 – Surveillance Report. pg. 1-123. Stockholm.

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). HIV/AIDS surveillance in Europe 2013 – Surveillance Report. pg. 1-95. Stockholm.

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). Sexually Transmitted Infections in Europe, 2013 – Surveillance Report. pg. 1-112. Stockholm.

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). Annual Epidemiological Report for 2016 – Surveillance Report Syphilis. pg. 1-8. Stockholm, July 2018.

Fitzgerald, T.J. (1981). Pathogenesis and immunology of *Treponema pallidum*. *Annual Review of Microbiology*. Vol: 35, pg. 29-54. Doi: 10.1146/annurev.mi.100181.000333.

Fleming, DT., Wasserheit, JN. (1999). From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sexually Transmitted Infections*, In: *British Medical Journals*. Volume: 75, Issue: 1, pg. 3-17. Doi: 10.1136/sti.75.1.3

Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Ketchum KA, Sodergren E, Harham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalk H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Fujji C, Garland S, Hatch B, Horst K, Roberts K, Sandusky M, Weidman J, Smith HO, Venter JC. (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum* the syphilis spirochete. *Science*. Vol: 281, Issue: 5375, pg. 375-388. Doi: 10.1126/science.281.5375.375

French, P., Gomber, M., Janier, M., Schmidt, B., Voorst Vader, P., Young, H. (2009). IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *International Journal of STD & AIDS*. Vol: 20, Issue: 5, pg. 300-309. Doi: 10.1258/ijsa.2008.008510.

Frith. J. (2012). Syphilis – Its Early History and Treatment until Penicillin, and the Debate on its Origins. *Journal of Military and Veteran's Health*. Volume 20, N° 4, pg. 49-58.

Gama, A., Carrilo-Casas, EM., Hernández-Castro, R., Vázquez-Aceituno, VA., Toussaint-Caire, S., Xicohtencatl-Cortes, J., Fernández-Martínez, R., Moreno-Coutino, G. (2017). *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* identification by real-time PCR targeting the *polA* gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. *International Journal of STD & AIDS*. Vol: 28, Issue: 13, pg. 1299-1304. Doi: 10.1177/0956462417704123.

Gayet-Ageron, A., Lautenschlager, S., Ninet, B., Perneger, TV., Combescure, C. (2013). Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sexually Transmitted Infections*. Vol: 89, Issue: 3, pg. 251-256. Doi: 10.1136/sextans-2012-050622.

Gayet-Ageron, A., Combescure, C., Lautenschlager, S., Ninet, B., Perneger, TV. (2015). Comparison of Diagnostic Accuracy of PCR Targeting the 47-Kilodalton Protein Membrane Gene of *Treponema pallidum* and PCR Targeting the DNA Polymerase I Gene: Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 53, Issue: 11, pg. 3522-2529. Doi: 10.1128/JCM.01619-15.

Gayet-Ageron, A., Laurent, F., Schrenzel, J., Charton, B., Jimenez-Getaz, G., Tangomo, M., Ferry, T., Sednaoui, P., Lautenschlager, S., Toutous-Trellu, L., Tejada, BM., Cavassini, M., Emonet, S., Perneger, T., Salord, H. (2015 a). Performance of the 47-Kilodalton Membrane Protein versus DNA Polymerase I Genes for Detection of *Treponema pallidum* by PCR in Ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 53, Issue: 3, pg. 976-980. Doi: 10.1128/JCM.03444-14.

Geisler, WM. (2004). The Prozone Phenomenon in Syphilis Testing. *Southern Medical*

Journal. Vol: 97, N°: 4, pg. 327-328. Doi:10.1097/01.SMJ.0000092571.52330.13

George, RW., Pope, V., Larsen, SA. (1991). Use of the Western Blot for the Diagnosis of Syphilis. *Clinical Immunology Newsletter*. Vol: 11, Issue: 8, pg. 124-128. Doi: 10.1016/0197-1859(91)90031-M.

Ghanem, KG., Erbeling, EJ., Cheng, WW., Rompalo, AM. (2006). Doxycycline compared with benzathine penicillin for the treatment of early syphilis. *Clinical Infectious Diseases*. Vol: 42, Issue 6, pg. 45-49. Doi: 10.1086/500406

Gjestland, T. (1995). The Oslo study of unrelated syphilis: An epidemiologic investigation of the natural course of syphilitic infection based on a restudy of the Boeck-Bruusgaard material. *Acta Dermato-Venereologica*. Vol:53, Supplementum 34, pg. 3-368.

Grange, PA., Gressier, L., Dion, PL., Farhi, D., Benhaddou, N., Gerhardt, P., Morini, JP., Deleuze, J., Pantoja, C., Bianchi, A., Lassau, F., Avril, MF., Janier, M., Dupin, N. (2012). Evaluation of a PCR Test for Detection of *Treponema pallidum* in Swabs and Blood. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 50, Issue: 3, pg. 546-552. Doi: 10.1128/JCM.00702-11

Handsfield, H. H., Lukehart, SA., Sell, S., Norris, J. S., Holmes, K.K. (1983). Demonstration of *Treponema pallidum* in a cutaneous gumma by indirect immunofluorescence. *Archives of Dermatology*. Vol: 119, Issue 8, pg. 677-680

Hardy, PH., Levin, J. (1983). Lack of endotoxin in *Borrelia hipanica* and *Treponema pallidum*. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*. Vol: 174, Issue 1, pg. 47-52. Doi: 10.3181/00379727-174-41702.

Harter, C., Benirschke, K. (1976). Fetal syphilis in the first trimester. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1976. Volume 124, Issue 7, pg. 705-711. Doi:10.1016/S0002-9387(16)33340-3.

Hay, PE., Clarke, JR., Strugnell, RA., Taylor-Robinson, D., Goldmeier, D. (1990). Use of the polymerase chain reaction to detect DNA sequences specific to pathogenic treponemes in cerebrospinal fluid. *FEMS Microbiology Letters*. Vol: 56, Issue: 3, pg. 233-238. Doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb13943.x

Hazlett, K., Radolf, D.J., Lukehart, SA. (2006). *Pathogenesis of Syphilis*. In: Radolf, D.J, Lukehart, SA. Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology. Capítulo 10, pg.197-236. Caister Academic Press.

Herring, AJ., Ballard, RC., Pope, V., Adegbola, RA., Chagalucha, J., Fitzgerald, DW., Hook, EW., Kubanova, A., Mananwatte, S, Pape, JW., Sturm, AW., West, B., Yin, YP., Peeling, RW. (2006). A multi-centre evaluation of nine rapid, point-of-care syphilis tests using archived sera. *Sexually Transmitted Infections – British Medical Journals*. Vol: 82, Suppl5, pg. v7-v12. Doi: 10.1136/sti.2006.022707

Heymans, R., Van der Helm, JJ., de Vries, HJC., Fennema, HAS., Coutinho, RA., Bruisten, SM. (2010). Clinical Value of Treponema pallidum Real-Time PCR for Diagnosis of Syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 48, Nº:2, pg. 497-502. Doi: 10.1128/JCM.00720-09.

Hira, SK., Patel, JS., Bhat, SG., Chilikima, K., Mooney, N. (1987). Clinical manifestations of secondary syphilis. *International Journal of Dermatology*. Vol: 26, Issue 2, pg. 103-107. Doi: 10.1111/j.1365-4362.1987.tb00532.x

Hollander, DH., Turner, TB. (1957). Biology of the Treponematoses, Monograph Series Nº 35, World Health Organization, Geneva.

Holmes, K. K., Stamm, E. W., Piot, P., Sparling, Frederick. P., Wasserheit, N. J., Corey, L., Cohen, S. M., Watts, Heather. D. (2008). *Biology of Treponemes & Clinical Manifestations of Syphilis*. In: Holmes, K., Stamm, W., Piot, P., Sparling, P., Wasserheit, J., Cory, L., Cohen, M., Watts, D. Sexually Transmitted Diseases. Capítulo 36, pg. 647-659; Capítulo 37, pg. 661-684. 4ª edição. McGraw Hill.

Hook, EW., Martin, DH., Stephens, J., Smith, BS., Smith, K. (2002). A randomized, comparative pilot study of azithromycin versus benzathine penicillin G for treatment of early syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*. Vol:29, Issue: 8, pg. 486-490. Doi: 10.1097/00007435-200208000-00010

Houriham, M., Wheeler, H., Houghton, R., Goh, BT. (2004). Lessons from the syphilis outbreak in homosexual men in east London. *Sexually Transmitted Infections*. In: *British Medical Journals*. Vol: 80, Issue 6, pg. 509-511. Doi: 10.1136/sti.2004.011023.

INE – Instituto Nacional da Estatística. (2018). Estatísticas da Saúde 2016. *Instituto Nacional de Estatística*. ISSN 2183-1637. pg. 1-316. Lisboa, Portugal.

Jafari, Y., Peeling, RW., Shivkumar, S., Claessens, C., Joseph, L., Pai, NP. (2013). Are *Treponema pallidum* Specific Rapid and Point-of-Care Tests for Syphilis Accurate Enough for Screening in Resource Limited Settings? Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS One*. Vol: 8, Issue: 2, pg. 1-8. Doi: 10.1371/journal.pone.0054695.

Jaffe, HW, Larsen, SA, Jones, OG, Dans, PE. (1978). Hemagglutination tests for syphilis antibody. *American Journal of Clinical Pathology*. Vol: 70, Issue: 2, pg. 230-233. Doi: 10.1093/ajcp/70.2.230

Janeiro, D. (2012). Sífilis Congénita: Caracterização da Infecção e Avaliação de Técnicas Laboratoriais para o seu Diagnóstico. Dissertação de Mestrado pela Universidade Nova de Lisboa.

Jarzebowski, W., Caumes, E., Dupin, N., Farhi, D., Lascaux, AS., Piketty, C., de Truchis P, Bouldouyre, MA., Derradji, O., Pacanowski, J., Costagliola, D., Grabar, S. (2012). Effect of early syphilis infection on plasma viral load and CD4 cell count in human immunodeficiency virus-infected men: results from the FHDH-ANRS CO4 cohort. *Archives of International Medicine*. Vol: 172, Issue 16, pg. 1237-1243. Doi: 10.1001/archinternmed.2012.2706.

Juher, D., Saldaña, J., Kohn, R., Bernstein, K., Scoglio, C. (2017). Network-Centric Interventions to Contain the Syphilis Epidemic in San Francisco. *Scientific Reports*. Vol: 7, Nº: 6464, pg. 1-17. Doi: 10.1038/s41598-017-06619-9.

Kampmeier, RH. (1964). The late manifestations of syphilis: Skeletal, Visceral and Cardiovascular. *Medical Clinics of North America*. Vol: 48, Issue 3, pg. 667-697. Doi: 10.1016/S0025-7125(16)33449-6.

Kampmeier, RH. (1972). The Tuskegee study of untreated syphilis. *Southern Medical Journal*. Vol: 65, Issue 10, pg. 1247-1251.

Katz, KA., Pillay, A., Ahrens, K., Kohn, RP., Hermansteyne, K., Bernstein, KT., Ballard, RC., Klausner, JD. (2010). Molecular epidemiology of syphilis – San Francisco – 2004-2007. *Journal of the American Sexually Transmitted Diseases Association*. Vol: 37, Issue 10, pg. 660-663. Doi: 10.1097/OLQ.0b013e3181e1a77a.

Kiddugavu, MG., Kiwanuka, N., Wawer MJ., Serwadda, D., Sewankambo, NK., Wabwire-Mangen, F., Makumbi, F., Li,X., Reynolds, SJ., Quinn, TC., Gray, RH. (2005). Effectiveness of syphilis treatment using azithromycin and/or benzathine penicillin in Rakai, Uganda. *Sexually Transmitted Diseases*. Vol: 32, Issue 1, pg. 1-6. Doi: 10.1097/01.olq.0000148297.48590.d8.

Knox, JM., Short, DH., Wende, RD., Glicksman, JM. (1966). The FTA-ABS Test for Syphilis Performance in 1,033 Patients. *British Journal of Venereal Diseases*. Vol: 42, Issue: 1, pg. 16-20. Doi: 10.1136/sti.42.1.16

Kocher, MS., Caniza, M. (1996). Parrot Pseudoparalysis of the Upper Extremities: A Case Report. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. Vol: 78, Issue 2, pg. 284-287. Doi: 10.2106/00004623-199602000-00018

Koek, AG., Bruisten, SM., Dierdorp, M., van Dam, AP., Templeton, K. (2006). Specific and sensitive diagnosis of syphilis using a real-time PCR for *Treponema pallidum*. *Clinical Microbiology and Infection: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol: 12, Issue: 12, pg. 1233-1236. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01566.x

Kriesel, JD., Bhatia, AS., Barrus, C., Vaughn, M., Gardner, J., Crisp, RJ. (2016). Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. *International Journal of STD & AIDS*. Vol: 27, Issue: 14, pg. 1275-1282. Doi: 10.1177/0956462415615775

Laboquick. (2008). Laboquick Anti-Syphilis Test User's Manual pdf. *Koroglu Medical Devices Turkey*.

LaFond, RE., Lukehart, SA. (2006). Biological Basis for Syphilis. *Clinical Microbiology Reviews: American Society for Microbiology*. Vol: 19, Issue 1, pg. 29-49. Doi: 10.1128/CMR.19.1.29-49.2006.

Larsen, SA., Steiner, BM., Rudolph, AH. (1995). Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol: 8, Nº: 1, pg. 1-21.

Larsen, SA., Pope, V., Johnson, R., & Kennedy, E. (1998). A Manual of Tests for Syphilis (9th ed.). American Public Health Association. Washington, DC.

Larsen, SA., Norris, SJ., Steiner, BM., Rudolph, AH. (1998 a). Syphilis and Related Treponematoses. *Microbiology and Microbiology Infection*. Vol: 3, pg. 641-668. New York: Oxford University Press, Inc.

Lemos, EA., Belém, ZR., Santos, A., Ferreira, AW. (2007). Characterization of the Western blotting IgG reactivity patterns in the clinical phases of acquired syphilis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Vol: 58, Issue: 2, pg. 177-178. Doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.024.

Leon, SR., Ramos, LB., Vargas, SK., Kojima, N., Perez, DG., Caceres, CF., Klausner, JD. (2015). Laboratory Evaluation of a Dual-Path Platform Assay for Rapid Point-of-Care HIV and Syphilis Testing. *American Society for Microbiology – Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 54, N°: 2, pg. 492-494. Doi: 10.1128/JCM.03152-15.

Leslie, DE., Azzato, F., Karapanagiotidis, T., Leydon, J., Fyfe, J. (2007). Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 45, Issue: 1, pg. 93-96. Doi: 10.1128/JCM.01578-06.

Lewis, DA., Young, H. (2006). Syphilis. *Sexually Transmitted Infections*. In: *British Medical Journals*. Vol: 82, Issue 4, pg. 13-15. Doi: 10.1136/sti.2006.023085

Lien, TX., Tien, NTK., Chanpong, GF., Cuc, CT., Yen, VT., Soderquist, R., Laras, K., Corwin, A. (2000). Evaluation of Rapid Diagnostic Tests for the Detection of Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2, Hepatitis B Surface Antigen, and Syphilis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol: 62, Issue: 2, pg. 301-309. Doi: 10.4269/ajtmh.2000.62.301

Lipstiz, MC., Segura, ER., Castro, JL., Smith, E., Medrano, C., Clark, JL., Lake, JE., Cabello, R. (2014). Bringing Testing to the People – Benefits of mobile unit HIV/Syphilis testing in Lima, Peru 2007 – 2009. *International Journal of STD & AIDS*. Vol: 25, Issue: 5, pg. 325-331. Doi: 10.1177/0956462413507443.

Lithgow, KV., Cameron, CE. (2017). Vaccine development for syphilis. *Expert Review of Vaccines*. Vol: 16, Issue: 1, pg. 37-44. Doi: 10.1080/14760584.2016.1203262.

- Liu, H., Rodes, B., Chen, CY., Steiner, B.** (2001). New Tests for Syphilis: Rational Design of a PCR Method for Detection of *Treponema pallidum* in Clinical Specimens Using Unique Regions of the DNA Polymerase I Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 39, Issue: 5, pg. 1941-1946. Doi: 10.1128/JCM.39.5.1941-1946.2001
- Lopes, L., Ferro-Rodrigues, R., Llobet, S., Lito, L., Borges-Costa, J.** (2016). Sífilis: Prevalência num Hospital de Lisboa. *Acta Médica Portuguesa*. Vol: 29, Nº: 1, pg. 52-55. Doi: 10.20344/amp.6247
- Lukehart, SA., Hook III, EW., Baker-Zander, SA., Collier, AC., Critchlow, CW., Handsfield, HH.** (1988). Invasion of the central nervous system by *Treponema pallidum*: implications for diagnosis and treatment. *Annals of Internal Medicine*. Vol: 109, Issue: 11, pg. 855-862. Doi: 10.7326/0003-4819-109-11-855
- Mahoney, JF., Bryant, KK.** (1933). Contact infection of rabbits in experimental syphilis. *American Journal of Syphilis*. Vol: 17, pg. 188-193.
- Mahoney, JF., Arnold, RC., Sterner, BL., Harris, AD., Zwally, MR.** (1994). Penicillin Treatment of Early Syphilis: II. *JAMA*. 1944. Vol:126, Issue 2, pg. 63-67. Doi: 10.1001/jama.1944.02850370001001.
- Marangoni, A., Sambri, V., Olmo, A., D'Antuono, A., Negosanti, M., Cevenini, R.** (1999). IgG western blot as a confirmatory test in early syphilis. *International Journal of Medical Microbiology*. Vol: 289, Issue: 2, pg. 125-133. Doi: 10.1016/S0934-8840(99)80095-4
- Marra, CM., Boutin, P., McArthur, JC., Hurwitz, S., Simpson, PA., Haslett, JA., van der Horst, C., Nevin, T., Hook, EW.** (2000). A pilot study evaluating ceftriaxone and penicillin G as treatment agents for neurosyphilis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Clinical Infectious Diseases*. Vol: 30, Issue 3, pg. 540-544. Doi: 10.1086/313725.
- Mascola, L., Pelosi, R., Blount, JH., Alexander, CE., Cates, W.** (1985). Congenital Syphilis Revisited. *American Journal of Diseases of Children*. Vol: 139, Issue 6, pg. 575-580. Doi: 10.1001/archpedi.1985.02140080045030.
- Maton, A., Hopkins, J., Johnson, S., Warner, MQ., Wright, JD., McLaughlin, D.** (1993). Human Biology and Health. Prentice Hall Science. New Jersey, USA. ISBN: 0-13-981176-1.

Mehrabian, S., Raycheva, M., Traykova, M., Stankova, T., Penev, L., Grigorova, O., Traykov, L. (2012). Neurosyphilis with dementia and bilateral hippocampal atrophy on brain magnetic resonance imaging. *BCM Neurology*. Vol: 12, Issue: 96. Doi: 10.1186/1471-2377-12-96.

Mindel, A., Tovey, SJ., Timmins, DJ., Williams, P. (1989). Primary and secondary syphilis, 20 years' experience. 2. Clinical features. *Genitourinary Medicine*. Vol: 65, Issue 1, pg. 1-3.

Monojit, P., Subhrendu, SS. (2016). A Comparative Study of Clinically Suspected Syphilis Cases with Serological Test VDRL/RPR & *Treponema pallidum* Hemagglutination Assay (TPHA) in a Tertiary Care Hospital – Silchar Medical College & Hospital. *Journal of Science – Microbiology*. Vol: 6, Issue: 12, pg. 521-526.

Montova, PJ., Lukehart, SA., Brentlinger, PE., Blanco, AJ., Floriano, F., Sairosse, J., Gloyd, S. (2006). Comparison of the diagnostic accuracy of a rapid immunochromatographic test and the rapid plasma reagin test for antenatal syphilis screening in Mozambique. *Bulletin of the World Health Organization*. Vol: 84, Issue: 2, pg. 97-104. Doi: /S0042-96862006000200009

Moore, JE., Mahoney, JF., Schwartz, W., Sternberg, T., Wood, WB. (1944). The Treatment of Early Syphilis with Penicillin: A preliminary report of 1,418 cases. *JAMA*. 1944. Vol:126, Issue 2, pg. 67-73. Doi: 10.1001/jama.1944.02850370005002

Morshed, MG., Singh, AE. (2015). Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol: 22, Issue: 2, pg. 137-147. Doi: 10.1128/CVI.00681-14.

Mullick, CJ., Liappis, AP., Benator, DA., Roberts, AD., Parenti, DM., Simon, GL. (2004). Syphilitic hepatitis in HIV-infected patients: a report of 7 cases and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*. In: *Infectious Diseases Society of America*. Vol: 39, Issue 10, pg. 100-105. Doi: 10.1086/425501.

Mullis, KB. (1990). The Unusual Origin of the polymerase Chain Reaction. *Scientific American*. Vol: 262, Issue 4, pg. 56-61. Doi: 10.1038/scientificamerican0490-56.

Murawala, SM., Vegad, MM., Chudasama, VC., Priyadharsini, G., Gandhi, PV. (2015). Sero-prevalence and comparative study of diagnostic tests in syphilis in tertiary care teaching hospital, Western India. *Journal of Research in Medical and Dental Science*. Vol: 3, Issue: 3, pg. 199-203. Doi: 10.5455/jrmds.2015339

Murray, PR, Rosenthal, KS, Pfaller, MA. (2015). *Treponema, Borrelia and Leptospira*. In: PR. Murray, KS. Rosenthal, MA. Pfaller. Medical Microbiology. Capítulo 32, pg. 321-333. 8ª edição. Elsevier. Philadelphia.

Nah, EH., Cho, S., Kim, S., Cho, HI., Chai, JY. (2017). Comparison of Traditional and Reverse Syphilis Screening Algorithms in Medical Health Checkups. *Annals of Laboratory Medicine*. Vol: 37, Issue: 6, pg. 511-515. Doi: 10.3343/alm.2017.37.6.511

Naidu, NK., Bharucha, ZS., Sonawane, V., Ahmed, I. (2012). Comparative study of Treponemal and non-Treponemal test for screening of blood donated at a blood center. *Asian Journal of Transfusion Science*. Vol: 6, Issue: 1, pg. 32-35. Doi: 10.4103/0973-6247.95048.

Nandwani, R., Evans, DTP. (1995). Are You Sure It's Syphilis? A Review of False Positive Serology. *International Journal of STD & AIDS*. Vol: 6, Issue: 4, pg. 241-248. Doi: 10.1177/095646249500600404.

Nelson, AR., Mayer, MM., With the Assistance of Judith, A., Diesendruck, D, Eagan, TJ. (1949). Immobilization of *Treponema Pallidum* in Vitro by Antibody Produced in Syphilitic Infection. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol: 89, Issue: 4, pg. 369-393.

Norris. J.S, Cox. L.D, Weinstock, M.G. (2001). Biology of *Treponema pallidum*: Correlation of functional activities with genome sequence data. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. Vol: 3, Issue: 1, pg. 37-62.

Orle, KA., Gates, CA., Martin, DH., Body, BA., Weiss, JB. (1996). Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol: 34, Issue: 1, pg. 49-54.

Osredkar, J. (2017). "Point-of-Care Testing in Laboratory Medicine". In: Cheng, CM., Hsu, MY., Wu, MYC. (2017). Point-of-Care Diagnostics. Capítulo 1. pg. 1-28.

Palmer, HM., Higgins, SP., Herring, AJ., Kingston, MA. (2003). Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sexually Transmitted Infections*. Vol: 79, Issue: 6, pg. 479-483. Doi: 10.1136/sti.79.6.479

Parascandola, J. (2007). From Mercury to Miracle Drugs: Syphilis Therapy Over the Centuries. In: 38th International Congress for the History of Pharmacy. pg. 1-25. Sevilla.

Pereira, AA., Castro, SM., Venturini, RR., César, FO., Fortes, PM., Costa, PS. (2017). Pseudoparalysis of Parrot: A Diagnostic Aid in Congenital Syphilis. *The Journal of Pediatrics*. Vol: 190, pg. 282. Doi: 10.1016/j.jpeds.2017.07.048.

Pillay, A., Liu, H., Chen, CY., Holloway, B., Sturm, AW., Steiner B., Morse, SA. (1998). Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sexually Transmitted Diseases*. Vol: 25, Issue 8, pg. 408-414.

Pinto, VM, Tancredi, MV., Alencar, HDR., Camolesi, E., Holcman, MM., Grecco, JP., Grangeiro, A., Grecco, ETO. (2014). Prevalence of Syphilis and associated factors in homeless people of São Paulo, Brazil, using a Rapid Test. *Brazilian Journal of Epidemiology*. Vol: 17, Nº: 2, pg. 341-354. Doi: 10.1590/1809-4503201400020005ENG

Pinto, CS., Bordalo, A., Albuquerque, MJ., Ramos do Nascimento, MLP., Vicêncio, PO. (2016). Doenças de Declaração Obrigatória 2012-2015, Volume 1. *Direção-Geral da Saúde*. pg. 1-83. Lisboa, Portugal.

Quétel, C. (1992). *The Great Pox (16th Century)*. In: Quétel, C. History of Syphilis. Capítulo 3, pg. 50-72. Blackwell Publishers, UK.

Quétel, C. (1992 a). *From Pestilence to Disease: Seventeenth and Eighteenth Centuries*. In: Quétel, C. History of Syphilis. Capítulo 4, pg. 73-105. Blackwell Publishers, UK.

Quétel, C. (1992 b). *The Great Pox (16th Century); From Pestilence to Disease: Seventeenth and Eighteenth Centuries & The 19th Century Impasse*. In: Quétel, C. History of Syphilis. Capítulos 3-5, pg. 50-72, 73-105, 106-130. Blackwell Publishers, UK.

Radolf, DJ., Lukehart, SA. (2006). *Immunology of Syphilis*. In: Radolf, D.J., Lukehart, SA. Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology. Capítulo 13, pg. 285-322. Caister Academic Press.

Ratnam, S. (2005). The laboratory diagnosis of syphilis. *The Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. Vol: 16, Issue: 1, pg. 45-51.

Read, JS., Schleiss, MR. (2017). *Syphilis Treponema pallidum: Clinical Manifestations in the Infant*. In: Read, JS., Schleiss, MR. Congenital and Perinatal Infections. Capítulo 21. Oxford University Press. New York.

Richards, AN. (1964). Production of Penicillin in the United States (1941-1946). *Nature International Journal of Science*. Nature 201, pg. 441– 445. Doi:10.1038/201441a0

Riedner, G., Rusizoka, M., Todd, J., Maboko, L., Hoelscher, M., Mmbando, D., Samky, E., Lyamuya, E., Mabey, D., Grosskurth, H., Hayes, R. (2005). Single-dose azithromycin versus penicillin G benzathine for the treatment of early syphilis. *The New England Journal of Medicine*. Vol: 353, Issue 12, pg. 1236-1244. Doi: 10.1056/NEJMoa044284

Riley, BS., Oppenheimer, MN., Hansen, EJ., Radolf, JD., Norgard, MV. (1992). Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells. *The Journal of Infectious Disease*. Vol: 165, Issue: 3, pg. 484-493.

Rothner, AD., Klein, N. (1976). Parrot's Pseudoparalysis, Revisited. *The American Academy of Pediatrics*. Vol: 57, Issue 2.

Rowley, J., Toskin, I., Ndowa, F. (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. *World Health Organization*. Pg. 1-28.

Sacks, O. (2004). *A Doença de Cupido*. In: Sacks, O. O Homem que confundiu a Mulher com um chapéu. Capítulo 11, pg. 114-119. Relógio D'Água Editores.

Saral, Y., Dilek, AR., Dilek, N., Bahçeci, I., Ulasan, DZ. (2012). Serologic Diagnosis of Syphilis: Comparison of Different Diagnostic Methods. *Acta Dermatovenerologica Croatica: ADC*. Vol: 20, Issue: 2, pg. 84-88.

Sato, NS., Melo, CS., Zerbini, LC., Silveira, EP., Fagundes, LJ., Ueda, M. (2003). Assessment of the rapid test based on an immunochromatography technique for detecting anti-*Treponema pallidum* antibodies. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Vol: 45, Nº: 6, pg. 319-322. Doi: 10.1590/S0036-46652003000600004

Sato, NS. (2011). "Laboratorial Diagnosis of Syphilis". In: Sato, NS. Syphilis – Recognition, Description and Diagnosis. Capítulo 6, pg. 87-108. InTech. Doi: 10.5772/39126

Saxena, A. (2004). Dark ground microscopy and *Treponema* serology for diagnosis of early syphilis. *Journal of Clinical Pathology*. Vol: 57, Issue 12, pg.1263.

Schroeter, L.A., Turner, H. R., Lucas, B. J., William, J. B. (1971). Therapy for incubating syphilis: Effectiveness of gonorrhoea treatment. *JAMA*. 1971; 218(5) pg. 711-713. Doi:10.1001/jama.1971.03190180033006

Sena, AC., White, BL., Sparling, PF. (2010). Novel *Treponema pallidum* Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. *Clinical Infectious Diseases*. Vol: 51, Issue: 6, pg. 700-708. Doi: 10.1086/655832

Sheffield, JS., Sánchez, PJ., Morris, G., Maberry, M., Zeray, F., McIntire, DD., Wendel, GD. (2002). Congenital syphilis after maternal treatment for syphilis during pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol: 186, Issue 3, pg. 569-573. Doi: 10.1067/mob.2002.121541

Shields, M., Guy, RJ., Jeoffreys, NJ., Finlayson, RJ., Donovan, B. (2012). A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. *BMC Infectious Diseases*. Vol: 12, pg. 353. Doi: 10.1186/1471-2334-12-353.

Simcic, S., Potocnik, M. (2015). Serological diagnosis of syphilis: a comparison of different diagnostic methods. *Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica*. Vol: 24, Issue: 2, pg. 17-20. Doi: 10.15570/actaapa.2015.6

Singh, AE., Romanowski, B. (1999). Syphilis: Review with Emphasis on Clinical, Epidemiologic and Some Biologic Features. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol: 12, Issue 2, pg. 187-209.

Smajs, D., Matejková, P., Woznicová, V., Valisová, Z. (2006). Diagnosis of syphilis by polymerase chain reaction and molecular typing of *Treponema pallidum*. *Reviews in Medical Microbiology*. Vol: 17, Issue: 6, pg. 93-97. Doi: 10.1097/MRM.0b013e3280ad4150

Solomon, MM., Mayer, KH. (2015). Evolution of the syphilis epidemic among men who have sex with men. *Sexual Health*. Vol: 12, Issue: 2, pg. 96-102. Doi: 10.1071/SH14173

Spiteri, G. (2015). Sexually Transmitted Infections in Europe 2013 – Surveillance Report. *European Centre for Disease Prevention and Control*. Pg.1-124. Stockholm.

Stamm, LV. (2010). Global Challenge of Antibiotic-Resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol: 54, N°: 2, pg. 583-589. Doi: 10.1128/AAC.01095-09.

Stamm, LV. (2015). Syphilis: antibiotic treatment and resistance. *Epidemiology & Infection*. Vol: 143, Issue: 8, pg. 1567-1574. Doi: 10.1017/S0950268814002830

Stienstra, S., Peeters, T., van der Straaten, AM., Kadir, N. (1992). *Treponema pallidum* membrane protein A ELISA: a new test for screening and diagnosis of syphilis. *Contribution to Infusion Therapy*. Vol: 30, pg. 85.91.

Stokes, JH., Beerman, H., Ingraham, RN. (1944). Modern Clinical Syphilology. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.

Tampa, M., Sarbu, I., Mate, C., Benea, V., Georgescu, S. (2014). Brief History of Syphilis. *Journal of Medicine and Life*. Vol: 7, Issue: 1, pg. 4–10.

Tinajeros, F., Grossman, D., Richmond, K., Steele, M., Garcia, SG., Zegarra, L., Revollo, R. (2006). Diagnostic accuracy of a point-of-care syphilis test when used among pregnant women in Bolivia. *British Medical Journal – Sexually Transmitted Infections*. Vol: 82, Suppl: 5, pg. v17-v21. Doi: 10.1136/sti.2006.022640

Toskin, I., Murtagh, M., Peeling, RW., Blondeel, K., Cordero, J., Kiarie, J. (2017). Advancing prevention of sexually transmitted infections through point-of-care testing: target product profiles and landscape analysis. *Sexually Transmitted Infections, British Medical Journals*. Vol: 93, Issue: S4, pg. S69-S80. Doi: 10.1136/sextrans-2016-053071.

Turner, BT., Hardy, HP., Newman, B. (1969). Infectivity tests in syphilis. *British Journal of Venereal Diseases*. Vol: 45, Issue 3, pg. 183–195.

Valentine, JA., Bolan, GA. (2018). Syphilis Elimination: Lessons Learned Again. *The American Sexually Transmitted Diseases Association*. pg. 1-18. Doi: 10.1097/OLQ.0000000000000842.

Wang, L., Fan, S., Zheng, H., Li, J., Yao, Z. (2014). Detection of *polA* gene in whole blood samples and preliminary observations with molecular subtyping of *Treponema pallidum*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. Vol: 94, Issue: 12, pg. 928-931. Doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2014.12.013.

Wheeler, HL., Agarwal, S., Goh, BT. (2004). Dark ground microscopy and *Treponema* serological tests in the diagnosis of early syphilis. *Sexually Transmitted Infections*. In: *British Medical Journals*. Vol: 80, Issue 5, pg. 411-414. Doi: 10.1136/sti.2003.008821

Wohrl, S., Geusau, A. (2007). Clinical update: Syphilis in Adults. *The Lancet*. Vol: 369, N°: 9577, pg. 1912-1914. Doi: 10.1016/S0140-6736(07)60895-2

Workowski, KA., Berman, SM. (2006). Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006. *Centre for Disease Control and Prevention – Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. Vol: 55, N°: RR-11, pg. 1-94. Atlanta.

Workowski, KA., Bolan, GA. (2015). Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. *Centre for Disease Control and Prevention – Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Recommendations and Reports*. Vol: 64, N°: 3, pg. 1-140.

World Youth Report 2003. (2004). Department of Economic & Social Affairs. *United Nations*. Pg. 1-429.

Young, H. (1998). Syphilis. Serology. *Dermatologic Clinics*. Vol: 16, Issue: 4, pg. 691-698. Doi: 10.1016/S0733-8635(05)70034-6

Young, SD., Neil, M., Weiss, RE., Torrone, EA., Aral, SO. (2017). Using Social Media as a Tool to Predict Syphilis. *Preventive Medicine*. Vol: 109, pg. 58-61. Doi: 10.1016/j.ypmed.2017.12.016

Yue-Ping, Y., Chen, XS., Wei, WH., Gong, KL., Cao, WL., Yong, G., Feng, L., Huang, SJ., Wang, DM., Chen, YHSC, Mabey, D., Peeling, RW. (2013). A Dual Point-of-Care Test Shows Good Performance in Simultaneously Detecting Nontreponemal and Treponemal Antibodies in Patients with Syphilis: A Multisite Evaluation Study in China. *Clinical Infectious Diseases – Oxford Academic*. Vol: 56, Issue: 5, pg. 659-665. Doi: 10.1093/cid/cis928

Zhou, P., Gu, Z., Xu, J., Wang, X., Liao, K. (2005). A study evaluating ceftriaxone as a treatment agent for primary and secondary syphilis in pregnancy. *Sexually Transmitted Diseases*. Vol: 32, Issue 8, pg. 495-498. Doi: 10.1097/01.olq.0000170443.70739.cd

Zhuang, YH., Tian, Y., Chen, Y., Tang, J., Wang, JQ., Li, P., Li, Q., Jiang, YQ. (2012). Evaluation of the Determine Syphilis TP assay for the detection of antibodies against *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Vol: 31, Issue: 6, pg. 929-935. Doi: 10.1007/s10096-011-1388-6.

Zorzi, A., Cordioli, M., Gios, L., Del Bravo, P., Toskin, I., Peeling, RW., Blondeel, K., Cornaglia, G., Kiarie, J., Ballard, R., Mirandola, M. (2017). Field evaluation of two point-of-care tests for syphilis among men who have sex with men, Verona, Italy. *British Medical Journals – Sexually Transmitted Infections*. Vol: 93, Suppl: 4, pg. S51-S58. Doi: 10.1136/sextrans-2016-053065